BULLETIN
VAN HET
DELI PROEFSTATION
TE
MEDAN — SUMATRA
No. 29

# Invloed van den vochtigheidstoestand van den grond op de slijmziekte, veroorzaakt door Bacterium solanacearum E. F. S.

DOOR

**Mej. Dr. J. H. H. van der Meer,**

Plantkundige aan het Instituut voor Phytopathologie,
laboratorium voor Mycologie en
Aardappelonderzoek te
Wageningen.

(with summary in English)

Typ. VAREKAMP & Co., MEDAN

# INVLOED VAN DEN VOCHTIGHEIDSTOESTAND VAN DEN GROND OP DE SLIJMZIEKTE, VEROORZAAKT DOOR BACTERIUM SOLANACEARUM E. F. S.

door

**Mej. Dr. J. H. H. VAN DER MEER,**

Plantkundige aan het Instituut voor Phytopathologie, Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek te Wageningen.

## INLEIDING.

Gedurende den tijd van December 1927 tot Augustus 1928, dien ik als „fellow" van de „International Education Board"[1]) aan het Deli Proefstation te Medan doorbracht, werd op aanraden van Dr. J. KUIJPER, Directeur, en Dr. S. C. J. JOCHEMS, onder-Directeur van genoemde inrichting, een studie gemaakt over den invloed, dien de vochtigheidsgraad van den grond heeft op de snelheid, waarmee *Bacterium solanacearum* de plant aantast en te gronde richt.

De ervaringen uit de practijk zoowel in Deli als elders wijzen er op, dat de vochtigheidstoestand van den bodem ten opzichte van de slijmziekte een belangrijke factor is. Deze werkt op tweeërlei wijze.

1° In de eerste plaats heeft men waargenomen, dat een door overmaat van vocht, hetzij door hoogen grondwaterstand, hetzij door langdurige regens, in ongunstigen toestand verkeerende bodem het slijmziekteproces bevordert. (VAN BREDA DE HAAN: 3 [2]), GARNER, WOLF & MOSS: 9, HUNGER: 16, JOHNSON: 21, PALM: 27 en 28, SMITH: 32, SMITH & GODFREY: 33, UYEDA: 34). In verband hiermee zij opgemerkt, dat in Rangpur de slijmziekte van tabak bekend is onder den naam „Rasa", dat vochtigheidsziekte beteekent (HUTCHINSON: 18). De groote invloed van den toestand van den grond op de slijmziekte was oorzaak, dat men in Deli langen tijd twijfelde aan haar parasitair karakter en meende met een cultuurziekte te doen te hebben (DE BUSSY: 4 en 5).

---

[1]) Sinds 1 Jan. 1929 „Rockefeller Foundation".

[2]) De cijfers achter de auteursnamen verwijzen naar de litteratuurlijst achterin.

In 1910 heeft HONING (14) door grondige onderzoekingen vastgesteld, dat *Bacterium solanacearum* de oorzaak der slijmziekte is. Veertien jaar later kwam PALM (28) tot de uitspraak, dat cultuuromstandigheden wel een zeer groote rol bij het optreden van de ziekte in kwestie spelen, doch dat geen slijmziekte ontstaat zonder een infectie van een bepaalde bacterie.

De waarnemingen uit de praktijk leeren, dat goede drainage de slijmziekte in haar uitbreiding kan beperken. Op den tabakskalender van het Deli Proefstation heeft men dan ook voor de maanden Augustus, September en November met klem aanbevolen, de drainages vooral goed te onderhouden. In de Mededeelingen van het Deli Proefstation in 1924 vermeldt PALM (28) gevallen, waar na flinke en geregelde ontwatering slijmzieke afdeelingen tusschen 30 en 50% minder slijmziekte hebben opgeleverd.

2°. In de tweede plaats heeft men waargenomen, dat eenmaal aangetaste planten bij sterke droogte sneller te gronde gaan en zoodoende het verlies aan product grooter wordt. (COOK: 7, VAN HALL: 11, HUNGER: 16, JOHNSON: 21, SMITH & GODFREY: 33). JOHNSON (21) vermeldt, dat droog weer de slijmziekte-symptomen versterkt, het verwelken der planten bespoedigt.

Hoe sterk de uitbreiding van slijmziekte door het weer beinvloed wordt, blijkt wel uit de volgende opmerking van DE BUSSY (6): „Dikwijls ziet men in Deli, dat een aanplant, die veel slijmziekte gaat vertoonen, na een gunstige kentering van het weer plotseling veel beter gaat staan".

Aldus zijn de waarnemingen uit de practijk van de planten te velde. Het was nu de vraag, of die invloed van den vochtigheidsgraad van den grond op de slijmziekte experimenteel is vast te stellen en in welke richting een eventueele verklaring der feiten te zoeken is. Daarvoor waren potproeven noodig, waarbij planten aan een kunstmatige infectie werden blootgesteld.

Aan het Deli Proefstation werden reeds eenige proeven genomen met potplanten, waaruit viel op te maken, dat de ziekte des te eerder uitbreekt naar mate de vochtigheidsgraad van den grond grooter is (KUIJPER: 23, PALM: 29). Volgens PALM (29) kan de slijmziekte-bacterie in grond van gering vochtigheidsgehalte niet meer leven; voor den rooden heuvelgrond zou dit gehalte 7 à 8% bedragen.

Schrijfster werkte met tomaten, omdat deze de slijmziekteverschijnselen zeer spoedig vertoonen, zoodat in denzelfden tijd meer proeven met deze planten dan met tabak genomen konden worden. In de eerste plaats werden verschillende infectiemethoden

toegepast, terwijl bij elk dier methoden drie reeksen potten gebruikt werden, nl. één, die een kleine hoeveelheid water kreeg, één met middelmatige en één met een groote hoeveelheid water. De beoordeeling had plaats hoofdzakelijk op grond van de uitwendige symptomen.

Ten tweede werden proeven ingezet, om de vraag te beantwoorden, hoe de bacterie zich in den stengel verspreidt onder invloed van meer en minder vocht; een beoordeeling dus op grond van inwendige kenmerken.

Hierbij sloot aan de vraag, welke de oorzaak van de ongelijke snelheid en wijze van verspreiding van de bacteriën in den plant bij verschillenden vochtigheidstoestand kon zijn.

Als laatste punt kwam toen aan de orde, van welken aard de verwelkingsverschijnselen der bladeren van slijmzieke planten zijn; of hierbij de bacteriën een directe of indirecte rol spelen. Behalve tomaat diende nu ook tabak als proefplant. Daar slijmzieke tabaksbladeren niet alleen verwelkingssymptomen vertoonen, maar vaak nog gekenmerkt zijn door eigenaardige bruine vlekken werd nagegaan, welke factoren het ontstaan daarvan bewerkstelligen.

De stof is als volgt ingedeeld:

§ 1. Infectieproeven met tomaat bij verschillenden vochtigheidsgraad van den bodem.
- Algemeene inrichting der proeven.
- Infectie in op natuurlijke wijze besmetten grond.
- Kunstmatige infectie door een wond in den stengel.
- Kunstmatige grondinfectie vóór het planten der bibit.
- Kunstmatige grondinfectie ná het planten der bibit.
- Kunstmatige grondinfectie vóór het zaaien.

§ 2. Verspreiding van Bacterium solanacearum in den stengel van tomaat na wondinfectie bij verschillend watergehalte van den bodem.
- Werkmethode.
- Resultaten.

§ 3. Groei van Bacterium solanacearum op droge en vochtige voedingsmedia.

§ 4. Invloed van inwendige factoren op het ontstaan der slijmziektesymptomen.

§ 5. Invloed van uitwendige factoren op het ontstaan der slijmziektesymptomen in het blad bij tabak.

§ 6. Korte samenvatting der resultaten.

## § 1. Infectieproeven met tomaat bij verschillenden vochtigheidsgraad van den bodem.

### Algemeene inrichting der proeven.

De tomaat-kiemplanten werden in groote potten, elk met 6 KG. aarde, geplant, telkens vier per pot. Van tevoren waren de potten flink uitgewasschen met kaliumpermanganaat (½% oplossing). De grond was met stoom gedesinfecteerd volgens de „box and grid" methode tot minstens 70° C. De potten werden in drie groepen verdeeld, waarvan de eerste zoo weinig mogelijk, de tweede een normale hoeveelheid en de derde extra veel water kreeg. De potten der derde groep waren vóór het in gebruik nemen gedompeld in verwarmde floatine, een asphaltachtig product, dat tot een zwarte korst opdroogt. De floatinelaag belette het verdampen van vocht uit de natte aarde door den poreuzen potwand heen; het gat in den bodem was echter open. De potten stonden in bakjes, zoodat het water, dat eventuëel uit deze opening sijpelde, niet verloren ging. In iedere groep ontving elke pot een gelijk quantum water, afgemeten in een maatglas. Het begieten geschiedde met leidingwater en had gewoonlijk 's morgens omstreeks 8 uur en 's middags omstreeks 3 uur plaats. De watertoevoer werd zoo geregeld, dat de planten van groep 1 nog juist niet verwelkten, die van groep 2 zich in goede conditie bevonden en die van groep 3 welig opschoten. De potten waren geplaatst op houten rekken onder een afdak.

Het infectiemateriaal voor alle verder te melden proeven bestond uit ± 2 dagen oude reinculturen van *Bacterium solanacearum* in bouillon. In Januari 1928 was de bacterie geisoleerd uit slijmzieke tabak, voorkomend op het terrein van het Deli Proefstation. Door 14-maal opnieuw infecteeren van gezonde tabak-of tomaat-plantjes en herisoleeren van den parasiet behield de reincultuur van *Bacterium solanacearum* haar virulentie.

De helft van het aantal proefplanten diende als controle.

Van alle planten, welke slijmziektesymptomen vertoonden, werd nagegaan of bacterien in den stengel voorkwamen. In de meeste gevallen gebeurde dit met het microscoop.

### Infectie in op natuurlijke wijze besmetten grond.

Voor deze proef werden 12 potten gevuld met grond, afkomstig van een zeer slijmziek veld van den proeftuin van het Deli Proefstation, en 12 met grond van een ander stuk van dit terrein,

waar men in tien jaar geen tabak gekweekt had en waarvan verwacht kon worden, dat het bijna slijmziektevrij was. Laastgenoemde (12) waren de contrôle-potten.

Tegelijkertijd werd een dergelijke proef ingezet, waarbij elke pot inplaats van 6 KG. lossen, 8 KG. vastgestampten grond bevatte. Het was de bedoeling na te gaan, of de mate van luchtcirculatie in den bodem het slijmziekteproces zou beinvloeden.

De tomaatkiemplantjes van ruim een week oud, uit zaad opgekweekt in petrischalen op vochtig filtreerpapier, sloegen niet alle aan, zoodat de aantallen planten in iedere groep verschillen. Oorspronkelijk waren in elke pot 3 plantjes gezet. Een week na het planten werden potten in drie groepen verdeeld. Gedurende de volgende 20 dagen was de begieting zoodanig, dat elke pot van de 1e. groep totaal ontving 1,74 l., van de 2e. groep 2,52 l. en van de 3e. groep 5,04 l. water, dat is dus gemiddeld per dag voor elken pot van de 1e. groep 87 cc., van de 2e. groep 126 cc., en van de 3e. groep 252 cc. De verhouding van de toegediende hoeveelheden vocht in de 3 groepen was dus als 2 : 3 : 6.

De toestand der planten na die periode van 20 dagen was als volgt:

| | 1e. reeks: losse grond | 2e. reeks: vastgestampte grond |
|---|---|---|
| 1e. groep van 4 potten | 0 van de 4 planten slijmziek | 0 van de 8 planten slijmziek |
| 2e. idem | 0 van de 3 planten slijmziek | 0 van de 3 planten slijmziek |
| 3e. idem | 6 van de 7 planten slijmziek | 4 van de 5 planten slijmziek |

De eerste ziektesymptomen verschenen een week, nadat met genoemde begieting begonnen was. In de contrôle kwam geen ziekte voor (aantal planten van de 1e. reeks totaal: 5 — 5 — 4 en van de 2e. reeks: 8 — 6 — 12).

Dus: groote vochtigheid van den bodem bevordert het slijmziekteproces. Aangaande den invloed van den lossen of vasten toestand van den grond gaf deze proef geen positieven uitslag.

Daarna werden de potten met tomaten der eerste en tweede groep, zoowel die met lossen als die met vastgestampten, zieken grond, verdeeld in twee partijen D (droog) en V (vochtig). Gedurende 13 dagen kreeg elke pot van D totaal 1,38 l. water en van V 5,88 l., dat is gemiddeld per dag voor D 106 cc. en voor V 452 cc. Naar het quantum toegediend vocht verhielden de partijen D en V zich dus als 1 : 4.

Bij D. werden 2 van de 10 planten en bij V. 5 van de 7 planten slijmziek.

Deze proef leerde dus, dat in zeer drogen grond ten slotte wel slijmziekte kan optreden, maar dat een groote vochtigheidsgraad van den bodem het ziekteproces aanzienlijk versnelt. Voorts viel er uit op te maken, dat de grond in de potten der 1e. en 2e. groep wel degelijk besmet was en het wegblijven der ziektesymptomen in de vorige proefneming uitsluitend aan een laag watergehalte van den bodem was toe te schrijven.

Daarna werden de diverse planten uit den grond genomen en het wortelstelsel schoongespoeld om dit nader te onderzoeken. Alle contrôle-planten, afkomstig uit den lossen grond (1e. reeks), ook die der met floatine bedekte potten, hadden een volkomen normaal wortelstelsel ontwikkeld. Bij de pas verwelkende zieke planten der eerste reeks viel evenmin wortelrot te constateeren. Eenige tomaten uit den vastgestampten wel- en niet-besmetten bodem vertoonden doode worteltoppen. Niettegenstaande deze beschadiging van het wortelstelsel trad de slijmziekte niet heviger in de tweede reeks planten op. Figuur I toont naast elkaar een gezonde, forsche contrôle- en een kleine, zieke tomaat, beide gedurende 5½ week groeiend in den zeer vochtigen, lossen grond van een met floatine bedekten pot. Van de eerstgenoemde plant is het wortelstelsel normaal, krachtig, van de tweede wel klein, maar slechts met een enkel bruin wortelstukje. Van wortelrot is geen sprake.

### Kunstmatige infectie door een wond in den stengel.

Deze proef bestond uit drie groepen, elk van 6 potten, waarvan telkens 3 (totaal 12 planten) voor infectie, de andere voor contrôle dienden. De tomaat-kiemplantjes werden gekweekt in grond, welke vooraf in de autoclaaf boven 100° C gedesinfecteerd was. Bij het verplanten waren ze ongeveer drie weken oud. De eerste vier dagen werd door een normale watertoediening voor het behoorlijk aanslaan der verspeende bibit gezorgd, zoodat geen

enkel plantje dood ging. Dan volgden drie dagen, waarin aan de drie groepen planten per pot een totale hoeveelheid water werd gegeven van resp. 30 cc., 300 cc. en 840 cc., dus in de verhouding 0.1 : 1 : 3. Daarop had infectie plaats met een steriele naald, die, aan den top een druppeltje bouilloncultuur dragend, het stengeltje vlak boven de zaadlobben doorpriemde. De contrôle-planten ondergingen dezelfde behandeling maar zonder bacteriebesmetting. Den eersten dag na de infectie kregen de potten respectievelijk 10 cc, 30 cc en 240 cc water, den tweeden dag 10 cc, 100 cc en 240 cc.

Het resultaat was als volgt:

| | 1 dag na de infectie: | 2 dagen na de infectie: |
|---|---|---|
| groep 1 | 8 % slijmziekte | 8 % slijmziekte |
| „ 2 | 8 % „ | 16 % „ |
| „ 3 | 50 % „ | 75 % „ |

Weer twee dagen later werden de planten gefotografeerd (Fig. II). Groep 1 telde toen 50 %, groep 2 100 % en groep 3 100 % zieken. De contrôle-planten bleven alle gezond.

Uit deze proef is dus op te maken, dat het ziekteproces sneller verloopt naarmate de bodem vochtiger is. Het is, of men het optreden der ziekte willekeurig regelen kan met het toedienen van veel of weinig water.

Hierbij zij vermeld, dat in een voorloopige proef met twee weken oude tomatenplanten, die door een wond in het hypocotyl waren geinfecteerd, reeds de invloed van natten bodem te constateeren viel. Voor de infectie was de vochtigheidsgraad voor alle 12 plantjes, die voor deze proef gebruikt werden, zoo gelijk mogelijk gemaakt. De helft ervan kreeg daarna geen druppel water meer, de overige 6 potjes werden 3 aan 3 in een bakje water gezet. Fig. III toont aan, dat de tomaten in het tweede geval het ergst van slijmziekte te lijden hadden; de contrôle (rechts) bleef gezond; de foto geeft den toestand 1 dag na de infectie weer.

**Kunstmatige grondinfectie vóór het planten der bibit.**

Voor deze proef werd in 12 potten de bovenste laag grond vermengd met den inhoud van 2 buizen reincultuur van *Bacterium solanacearum* in bouillon, dat is ± 20 cc vloeistof. De 12 contrôlepotten ontvingen een gelijke hoeveelheid steriele bouillon. Per pot werden 4 tomaten geplant.

Het plantmateriaal bestond uit ± 2½ week oude tomaten-bibit, opgegroeid in grond, welke in de autoclaaf gedesinfecteerd was. Gedurende 12 dagen werd aan de 3 groepen geinfecteerde planten, elk dus bestaande uit 16 stuks, een hoeveelheid water toegediend in de verhouding 1 : 2 : 5. De totale hoeveelheid per pot bedroeg resp. 0,59 l., 1,06 l., en 3,07 l., dus gemiddeld per dag 49 cc, 88 cc en 256 cc.

Aan het eind van deze periode was de toestand als op Fig. IV is weergegeven:

| | | | |
|---|---|---|---|
| groep | 1: | 0 % | slijmziekte |
| groep | 2: | 25 % | „ |
| groep | 3: | 75 % | „ |

In de contrôle, eveneens uit 48 planten bestaande, trad geen ziekte op.

Uit de foto blijkt duidelijk, hoe sterk de groei van de drie diverse groepen contrôle-planten onderling verschilde; in den vochtigsten grond hadden de tomaten zich het krachtigst ontwikkeld.

De allereerste symptomen kwamen in de 3e groep vijf dagen en in de 2e groep zeven dagen na het planten te voorschijn.

Ook deze proef leert dus, dat het ziekteproces des te sneller verloopt, naarmate het water gehalte van den bodem grooter is.

In de sterk vochtig gehouden aarde der floatinepotten hadden de tomaten een normaal wortelstelsel gevormd. Wortelrot kwam noch bij de contrôle, noch bij de pas verwelkende zieke planten voor, zooals Fig. V toont.

**Kunstmatige grondinfectie ná het planten der bibit.**

In deze proef werd gewerkt met 24 potten gedesinfecteerden grond, waarin per pot 4 ± 4 weken oude tomaatplantjes (gekweekt in bakken met in de autoclaaf gedesinfecteerde aarde) de eerste vijf dagen na het verspenen onder dezelfde normale omstandigheden opgroeiden. Daarna had indeeling in drie groepen plaats, welke gedurende drie dagen totaal per pot resp. 140 cc, 270 cc en

720 cc water kregen, dus in de verhouding 1 : 2 : ± 5. Thans waren de planten voor infectie gereed.

De aarde van elk der 12 contrôle-potten werd overgoten met een mengsel van 20 cc. sterielen bouillon en 100 cc. water. Op dezelfde wijze ontving elk der 12 infectie-potten 120 cc. vloeistof, die was verkregen door de inhoud van 2 buizen reincultuur van *Bacterium solanacearum* in bouillon (± 20 cc.) in een maatglas tot 120 cc. met water aan te vullen.

De daaropvolgende 11 dagen werden resp. de volgende hoeveelheden water per pot toegediend : 0.73 l, 1.4 l en 3 l, dus gemiddeld per dag 66 cc, 127 cc en 273 cc. De begieting der 3 groepen geschiedde dus in de verhouding 1 : 2 : 4.

Vijf dagen na de infectie traden de eerste slijmziekte-verschijnselen op in de derde groep, terwijl het acht dagen duurde vóór groep 2 ze vertoonde.

De infectie der 48 planten, verdeeld over 3 groepen, gaf den volgenden uitslag:

| | 5 dagen na de infectie | 11 dagen na de infectie |
|---|---|---|
| groep 1 | 0 % slijmziekte | 12½ % slijmziekte |
| „ 2 | 0 % „ | 50 % „ |
| „ 3 | 6 % „ | 81 % „ |

Onder de 48 contrôle-planten kwam één slijmziek exemplaar voor in de derde groep. Hierbij moet altijd gedacht worden aan de mogelijkheid, dat een pad of een ander dier door bezoeken aan de diverse potten de parasiet van den kunstmatig geinfecteerden grond overbrengt naar de niet-besmette aarde.

De resultaten der proef zijn dus in overeenstemming met die der vorige infectieproeven: grooter watergehalte van den bodem versnelt het slijmziekteproces. Verder blijkt, dat de slijmziekte vrijwel even snel optreedt onverschillig of grondinfectie ná of voor het planten heeft plaats gehad. In de laatste proef hadden de kiemplantjes 5 dagen gelegenheid gehad een goed wortelstelsel te vormen, zoodat men mag aannemen, dat de gevolgen der verwonding bij het overplanten verdwenen waren. Dit wor-

stelstelsel bleek door *Bacterium solanacearum* even goed aangetast te zijn als het pas door overplanten verwonde in de vorige proef.

Aan de wortelstelsels der van aanklevenden grond bevrijde planten viel geen wortelrot te bespeuren.

**Kunstmatige grondinfectie vóór het zaaien.**

De inrichting der proef kwam overeen met die van de kunstmatige grondinfectie vóór het planten der bibit (zie pag. 10). Inplaats van 4 kiemplanten waren nu in elken pot 8 tomatenzaden uitgezet.

Een week lang werden de drie groepen gelijkelijk begoten (d.w.z. gemiddeld 94 cc per pot per dag). De volgende 17 dagen ontvingen zij resp. totaal per pot 0,8 l, 1,6 l en 3,4 l, dus gemiddeld per dag 47 cc, 94 cc en 200 cc. De begieting had dus plaats in de verhouding 1: 2: 4.

De uitslag der proef was als volgt:

| | 15 dagen na het zaaien | 24 dagen na het zaaien |
|---|---|---|
| Groep 1 : 22 planten | 9 % slijmziekte | 9 % slijmziekte |
| „ 2 : 25 „ | 12 % „ | 72 % „ |
| „ 3 : 21 „ | 14 % „ | 67 % „ |

De contrôle-planten (aantal 23 — 23 — 24) bleven gezond.

De eerste ziektesymptomen verschenen in groep 3, namelijk 12 dagen na het zaaien, terwijl 3 dagen later de tweede groep de eerste slachtoffers vertoonde. In groep 1 kwamen 15 dagen na het zaaien 2 zieke exemplaren voor, daarna traden geen nieuwe gevallen meer op.

Bij het betrekkelijk vlug verschijnen der symptomen in groep 1 als ook het groote percentage zieken in groep 2 vergeleken bij groep 3, moet waarschijnlijk gedacht worden aan den vrij langdurigen vochtigen toestand van alle potten gedurende de eerste week, toen de jonge plantjes zich ontwikkelden, waardoor op zich zelf reeds een gunstige toestand voor slijmziekte-ontwikkeling ontstond.

Deze laatste proef leert ons weer, dat slijmziekte door een groot watergehalte van den bodem wordt bevorderd en dat *Bacterium solanacearum* wortels, die niet kunstmatig verwond zijn, kan binnendringen.

De infectieproeven met tomaat leiden dus tot de volgende conclusies:

1° Het slijmziekteproces wordt door een groot watergehalte van den bodem versneld.

2° Er is geen aanwijzing, dat wortelrot aanwezig moet zijn, om slijmziekte te doen optreden.

3° *Bacterium solanacearum* kan door niet kunstmatig verwonde worteldeelen naar binnen dringen.

Wat het tweede punt betreft, is de uitslag van mijn proeven in strijd met de opvatting van GROENEWEGE (10), dat „de slijmziekte, op grond van hetgeen bij nauwkeurige beschouwing aan de zieke plant kan worden waargenomen, wordt ingeleid door wortelrot, een gevolg van reductie of van een tijdelijke overmaat van water in den grond, waardoor de wortels door zuurstofgebrek afsterven".

In mijn proeven vertoonden de tomaten in de overmatig begoten, met floatine afgesloten potten, nooit wortelrot, noch de contrôle-planten noch de slijmzieke planten.

Tegenover het derde punt van mijn conclusies, dat *Bact. solanacearum* door niet-kunstmatig verwonde worteldeelen naar binnen kan dringen, staat de uitspraak van GROENEWEGE (10): „Wortelbeschadiging van geringen omvang bij gezonde krachtige planten is dus niet voldoende, om ze slijmziek te maken, al wordt *Bact. solanacearum* in groot aantal aan den bodem toegevoegd". In zijn proeven met Arachis hypogaea werd dichtbij een tamelijk groote plant een mes verticaal in den grond gestoken; enkele zijwortels worden dan altijd doorgesneden. Onmiddellijk daarna werd de grond begoten met een waterige suspensie van *Bact. solanacearum*. „Maar nooit heb ik daardoor de planten slijmziek zien worden", schrijft GROENEWEGE.

De resultaten van mijn kunstmatige grondinfectieproeven ná het planten der bibit en vóór het zaaien leidden tot een heel andere conclusie. Ofschoon de wortels niet met een mes beschadigd werden, drongen de bacteriën naar binnen en maakten de planten slijmziek.

GROENEWEGE meende, zooals hij mij in een gesprek te kennen gaf, dat het mogelijk is, dat de bouillon, die met de bacteriën in den grond gebracht werd, een dusdanige werking uitoefende, dat de wortels eenigszins beschadigd werden. Van ernstigen aard is die beschadiging zeker niet geweest, zoowel contrôle-, als geinfecteerde planten vormden een normaal wortelstelsel.

## § 2. Verspreiding van Bacterium solanacearum in den stengel van tomaat na wondinfectie bij verschillend watergehalte van den bodem.

In de tot nu toe besproken proeven over den invloed van vocht en droogte op slijmziekte werd uitsluitend rekening gehouden met het uitwendig ziektebeeld. Het lag voor de hand, thans het gedrag van den parasiet in het inwendige der planten meer nauwkeurig na te gaan.

### Werkmethode.

Tomaat-kiemplanten, gekweekt in gedesinfecteerden grond en verspeend in potten met gedesinfecteerde aarde (4 stuks per pot), werden een tijdlang in gelijke mate begoten. Zoodra zij een behoorlijken stengel hadden gevormd, kwamen ze voor infectie in aanmerking. Een paar dagen vóór het infecteeren werden de pottten verdeeld in twee partijen D (droog) en V (vochtig). De potten D ontvingen net zooveel leidingwater als noodig was om de bladeren turgescent te doen blijven, terwijl de potten V daarentegen een groote hoeveelheid vocht kregen; het door den grond heen sijpelend water verzamelde zich in een bakje onder den pot, zoodat de grond zeker niet kon uitdrogen. In beide gevallen werden de hoeveelheden water met een maatglas afgemeten.

Ten einde den groei van *Bacterium solanacearum* in droog gehouden planten zuiver te kunnen vergelijken, met dien in vochtig gehouden planten werd de wondinfectie-methode toegepast. Onderaan den stengel werd in het hout geprikt met een uitgegloeide naald, waaraan een druppeltje bouillon-reincultuur van *Bacterium solanacearum* hing (van den zelfden oorsprong als in § 1 is beschreven). Door de druppels zooveel mogelijk gelijk te nemen, bestond een redelijke kans ongeveer evenveel bacteriën binnen te brengen.

Twee tot vijf dagen na de infectie was de begieting dusdanig, dat de factoren droogte en vocht onveranderd hun invloed bleven uitoefenen.

De tomaten D en V werden gelijktijdig op de aanwezigheid van *Bact. solanacearum* onderzocht. Eerst geschiedde dit door het stengelgedeelte boven de infectiewond in stukjes van bepaalde lengte (1 — 3 cm.) te snijden, er op steriele wijze met een glasstaaf sap uit te persen en hiermee jonge tomaatplantjes door een wond te infecteeren. Geheel op dezelfde wijze werd gehandeld met de basis der bladstelen, waarvan vooraf de plaats van aanhechting

**Tabel I. Verspreiding van *Bacterium solanacearum* vanuit de infectiewond in den stengel van tomaat bij verschillenden vochtigheidsgraad van den bodem.**

**Tabel I. Spread of *Bacterium solanacearum* from the inoculation-wound up and down in the stem of tomato at different degrees of soil-humidity.**

| TOESTAND / CONDITION | Nummer der groepen van telkens 2 tomaten / No. of the inoculation of every two tomatoes | Verspreiding van Bact. sol. boven de inf. wond (in cm. uitgedrukt) / Spread of Bact. sol. above the inoculation wound (indicated in c.m.) | | Verspreidng van Bact. sol. onder de inf. wond (in cm. uitgedrukt) / Spread of Bact. sol. under the inoculation wound (indicated in c.m.) | | Ziektesymptomen + bet. verwelking - bet. geen verwelking / Symptoms of the disease, + means wilt - means no wilt | | Ouderdom tomaat / Age of the tomatoes | Verhouding begieting pot D : pot V vóór de inf. / Relation of the watering of pot D and pot V before inoculation | Verhouding begieting pot D : pot V ná de inf. / Relation of the watering of pot D and pot V after inoculation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | D dry | V humid | D dry | V humid | D dry | V humid | | | |
| 2 dagen na de infectie / 2 days after inoculation | 1 | 1 | 2 | | | — | — | 8 weken [4] | 3 dagen [5] 1 : 12 | 5 weken 1 : 6 |
| | 2 | 3 | 15 (t) [1] | | | — | 1 bl.[3] slap[6] | 4 weken | 2 dagen D: Occ. V: 720cc. | 4 dagen 1 : 7 |
| | 3 | 1-2 | 0.5-1 (1 plant 9) | 3 | 7.5(t) [2] | — | — | 5 weken | 2 dagen 1 : 37 | 2 dagen 1 : 37 |
| | 4 | | | 1 | 5.5(t) | — | — | | | |
| | 5 | | | 1.5 | 5 (t) | — | — | | | |
| | 6 | | | 0.5 | 10 (t) | — | — | | | |
| 3 dagen na de infectie | 7 | 0.25 | 3 | 0.25 | 7.5(t) | — | — | 5 weken | 2 dagen 1 : 37 | 2 dagen 1 : 37 |
| | 8 | 0.1 | 1 | 0.1 | 8.5(t) | — | — | | | |
| | 9 | 0.1 | 15.5(t) | 0.1 | 10. 5(t | — | — | | | |
| | 10 | 0.1 | 15.5(t) | 0.1 | 8(t) | — | — | | | |

1) t = top van den stengel = top of the stem.
2) t = top van den wortel = top of the root.
3) bl = bladeren = leaves.
4) weken = weeks.
5) dagen = days.
6) slap = limp.

| TOESTAND / CONDITION | nummer der groepen van telkens 2 tomaten / No. of the inoculation of every two tomatoes | Verspreiding van Bact. sol boven de inf. wond (in cm. uitgedrukt) / Spread of Bact. sol. above the inoculationwound (indicated in cm.) | | Verspreiding van Bact. sol. onder de inf. wond (in cm. uitgedrukt) / Spread of Bact. sol. under the inoculationwound (indicated in cm.) | | Ziektesymptomen + bet. verwelking - bet. geen verwelking / Symptoms of the disease, + means wilt - means no wilt | | Ouderdom tomaat / Age of the tomatoes | Verhouding begieting pot D : pot V vóór de inf. / Relation of the watering of pot D and pot V before inoculation | Verhouding begieting pot D : pot V ná de inf. / Relation of the watering of pot D and pot V after inoculation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | D dry | V humid | D dry | V humid | D dry | V humid | | | |
| 4 dagen na de infectie | 11 | 1 | 12 | 4 | 2 | 1 bl. slap | 4 bl. slap | 4 weken | 2 dagen D: 0 cc V : 720 cc | 4 dagen 1 : 7 |
| | 12 | 0.5 | 17.5 | 1 | 18 (t) | 1 bl. slap | 4 bl. slap | 6 weken | 2 dagen 1 : 24 | 4 dagen 1 : 7 |
| 5 dagen na de infectie | 13 | 7 | 15 (t) | | | — | + | 8 weken | 3 dagen 1 : 12 | 5 dagen 1 : 6 |
| | 14 | 0.5 | 11 (t) | 11(t) | 9 (t) | 1 bl. slap | 7 bl. slap | 4 weken | 2 dagen D 0 cc V 720 cc | 4 dagen 1 : 7 |
| | 15 | 7 | 10 (t) | 8.5 | 6.5(t) | + | + | 4 weken | 2 dagen D 0 cc V 720 cc | 4 dagen 1 : 7 |
| | 16 | 0.5 | 14 (t) | 0.5 | 20(t) | 1 bl. slap | alle 8 bl. slap | 6 weken | 2 dagen 1 : 24 | 4 dagen 1 : 7 |
| 6 dagen na de infectie | 17 | | 14 | 1 | 11.5(t) | door droogte verwelkend | + | 6 weken | 2 dagen 1 : 24 | 4 dagen 1 : 7 |
| 7 dagen na de infectie | 18 | 12(t) | (t) | | | — | geheel slap | 8 weken | 3 dagen 1 : 12 | 5 dagen 5 : 6 |

aan den stengel genoteerd was. Trad slijmziekte op in de met perssap geinfecteerde planten, dan was dit een bewijs voor de aanwezigheid van bacteriën. De symptomen vertoonden zich reeds een dag of drie na de behandeling. Later werd de aanwezigheid van *Bact. solanacearum* alleen uit microscopisch onderzoek der dwarsdoorsneden van stengel, bladstelen en wortel vastgesteld.

## Resultaten.

In tabel I zijn de resultaten in hoofdzaak samengevat.

Achtereenvolgens werden 18 partijen elk van 2 tomaten (D en V) aan infectie onderworpen. Na een bepaald aantal dagen werd nagegaan, hoever *Bact. solanacearum* zich vanaf de infectie-wond in boven- en benedenwaartsche richting verspreid had. Deze afstanden zijn in de 3e., 4e., 5e. en 6e. kolom uitgedrukt in cm. en wanneer het teeken (t) er achter geplaatst is, wil dat zeggen, dat de top van den stengel of wortel bereikt was. In de laatste 2 kolommen is aangegeven de verhouding van de hoeveelheden water, die een bepaald aantal dagen vóór en ná de infectie aan de potten D en V werden toegediend.

Het bleek, dat *Bact. solanacearum* zich van het punt van infectie af in de houtvaten van den stengel zoowel naar boven als naar beneden verspreidde. In de vochtig gehouden planten V ontwikkelde zich een overvloedige bacteriën-massa, die spoedig den top van stengel en wortel bereikte; de ziekteverschijnselen traden vlug op. Daarentegen ontstond in de weinig begoten planten D een veel geringere hoeveelheid bacteriën; soms waren ze alleen vlak boven en onder de infectiewond aanwezig. Ziektesymptomen verschenen niet of in geringe mate; zelfs in gevallen, waar *Bact. solanacearum* ten slotte nog vrij hoog in den stengel werd aangetroffen en verschillende bladeren eenige vaten met bacteriën in de bladsteelbasis vertoonden, was de heele plant toch volkomen turgescent.

Het viel op, dat de verspreiding der bacteriën soms grooter was in beneden- dan in opwaartsche richting. HONING (15) nam hetzelfde waar bij tabak.

Factoren, die op de verspreiding der bacteriën invloed kunnen uitoefenen, zijn a. transpiratiestroom, b. negatieve druk en c. vermenigvuldiging en actieve beweging van de organismen zelve.

Wanneer men met een naald een druppeltje waterige eosineoplossing in den stengel van een gezonde tomaat brengt, zijn alle bladeren, in loodrechte richting boven de wond gelegen, na een uur rood gekleurd. De bacteriënmassa in de houtvaten gedraagt zich anders dan de eosine oplossing. Van zulk een snelle verspreiding met den transpiratiestroom langs de vaten naar den stengeltop en het fijne adernet der diverse bladeren is geen sprake, want in dat geval zou een paar dagen na de infectie *Bacterium solanacearum* aan den geinfecteerden kant van de plant tot aan den top toe en in alle bladeren overvloedig aanwezig moeten zijn. De proeven leerden, dat de bacteriën in de houtvaten a.h.w. zuilvor-

mige massa's vormen, die aan beide kanten steeds langer worden en zich vertakken, wanneer zijbanen (bladstelen of zijwortels) dit mogelijk maken. Zoodra dit feit bij de eerste infecties was geconstateerd, werd afgezien van de vrij langdurige werkmethode met het perssap en overgegaan tot enkel microscopisch bestudeeren van dwarsdoorsneden gemaakt op verschillende hoogte van stengel en wortel.

Daar de bacteriënmassa in het sap der houtvaten eerder een suspensie dan een oplossing is, werden op gelijke wijze als boven is vermeld, stengelinfectieproeven genomen met de volgende suspensies: karmijn in water en Oost-Indischen inkt. Het bleek, dat deze kleurstoffen na 24 uur 3 — 4 cm. bóven en 3½ — 7 cm. ónder de infectiewond zichtbaar waren. Vermoedelijk zal het druppeltje vloeistof, dat door een prikwond in den stengel gebracht werd, door den negatieven druk in de houtvaten onmiddellijk over eenigen afstand vervoerd zijn. Deze factor zal waarschijnlijk ook bij de verspreiding van *Bacterium solanacearum* werkzaam zijn. Op die wijze is te verklaren het groote verschil in hoogte na eenzelfde aantal dagen in planten D en V bereikt.

Ten slotte komt nog de derde factor ter sprake. Door vermenigvulding en eenige spontane beweging der organismen zal de dichte massa in de houtvaten verder dringen. Krachtige deeling van eventueel door negatieven druk passief meegevoerde bacteriën zal de verspreiding van den parasiet versnellen.

Het bleek dus inderdaad, dat het betrekkelijk kleine quantum bacteriën, dat bij de infectie in de proefplanten gebracht werd, zich in vochtig gehouden tomaat veel sterker uitbreidde dan in de in drogen grond groeiende exemplaren. In verband hiermee zij opgemerkt, dat SMITH (32) bij zijn infectieproeven met *Bact. solanacearum* de ondervinding opdeed, dat in het algemeen infecties beter slaagden in „young, rapidly growing, soft, watery plants than in slow-growing woody ones or in mature ones".

De vraag deed zich nu voor, of deze sterke groei het gevolg was van het grootere quantum vocht, dat den bacteriën ter beschikking stond. Daartoe werden de volgende proeven genomen.

### § 3 Groei van Bacterium solanacearum op droge en vochtige voedingsmedia.

Het lag voor de hand in de eerste plaats den invloed van den factor vocht op den groei van *Bact. solanacearum* in reincultuur na te gaan.

Voor dit doel werd de bacterie in petrischalen gekweekt in bouillon en op bouillonagar van ½%, 1 %, 2 %, 3 % en 5 %. Dit was dus een reeks voedingsmedia met afnemend vochtgehalte. Voor zoover mogelijk werden de platen vóór het gebruik gedroogd. Door voorzichtig verwarmen boven een vlam ontstonden waterdruppeltjes aan het oppervlak van den agarbodem, die later verdampten en tegen het afgekoelde deksel der schaal condenseerden. Een herhaald drogen van het deksel en verwarmen van de plaat leidde tot een volkomen droog oppervlak van den voedigsbodem. De ½% en 1% bouillonagarplaten waren te slap om de behandeling te ondergaan.

Op alle platen (in duplo) werd nu met een platinadraad een oogje bouillonreincultuur van *Bact. solanacearum* uitgestreken. Den volgenden dag was de bouillon troebel en hadden zich op de ½% en 1% agarplaten vele kolonies ontwikkeld, terwijl de 2 %, 3 % en 5% agarbodems absoluut geen bacteriegroei verrieden. Ook na 6 dagen bleven de 2 — 5 % platen steriel. Op de ½% en 1% bodems groeiden de bacteriën welig. In het tweede geval hadden zich eenige, in het eerste geval vele kolonies vergroot.

De platen verschilden dus in agar-concentratie en in al- of niet-gedroogd oppervlak. In het vervolg werd de eerste factor uitgeschakeld en kwam alleen een 2% agarbodem voor de proeven in aanmerking.

Op 5 niet- en 8 wel- gedroogde 2% bouillon-peptonagarplaten werd een gelijk quantum *Bacterium solanacearum* uitgestreken. Na 2 dagen waren de 5 vochtige platen met een groot aantal kolonies bedekt, terwijl 5 der gedroogde bodems geen en 3 ervan slechts pleksgewijze bacterieontwikkeling vertoonden. Vier dagen later was de toestand dezelfde. Blijkbaar waren drie der platen onvoldoende gedroogd.

Vervolgens werden vier petrischalen met vloeibare 2% bouillonagar zoodanig schuin gezet, dat platen met hellend vlak ontstonden. Twee ervan ondergingen het drogingsproces. Het uitstrijken van *Bact. solanacearum* gaf na 2 dagen een negatief resultaat op de gedroogde, een positieven uitslag op de niet-gedroogde bodems. Daar, waar de plaat het dikst was, had de bacterie zich het krachtigst ontwikkeld; op het dunste deel waren de kolonies klein en bleven op zich zelf; vervloeiden dus niet.

Tenslotte werd nog een proef ingezet met 15 petrischalen, die elk 15 cc bouillonagar (2%) bevatten. De eerste groep van drie platen onderging het drogingsproces niet, de tweede 2 maal, de

derde 4 maal, de vierde 6 maal en de vijfde 8 maal. Twee dagen na het uitstrijken van *Bact. solanacearum* was het resultaat:

groep 1 en 2: vol bacteriekolonies.
groep 3 en 4: minder sterke bacterieontwikkeling.
groep 5: geen bacteriegroei, ook niet na 8 dagen.

Wanneer op den gedroogden voedingsbodem, dien *Bact. solanacearum* versmaadde, een gelijk quantum grondextract werd uitgestreken, zat de plaat twee dagen later vol bacteriën kolonies.

De proeven leeren dus, dat *Bact. solanacearum* in zijn groei belangrijk wordt vertraagd, wanneer weinig vocht beschikbaar is. Deze groote behoefte aan vocht kan één van de oorzaken zijn, waarom de bacterie zich veel sterker ontwikkelt in planten, die veel water opzuigen dan in die, waarin een veel geringere hoeveelheid vocht aanwezig is.

### § 4. Invloed van inwendige factoren op het ontstaan der slijmziektesymptomen.

In de eerste plaats werd de mogelijkheid onder oogen gezien, dat *Bact. solanacearum* door directe inwerking op het bladweefsel de typische slijmziektesymptomen zou veroorzaken.

Bij verschillende tomaten van reeds beschreven proeven werd de verspreiding der bacteriën in de bladeren bestudeerd op dezelfde wijze, als dat voor den stengel is aangegeven op bladz. 14. Al die gegevens zijn verzameld in Tabel II. De studieobjecten bestonden uit tomaten, onderworpen aan wondinfectie en groeiend in droge (D), sterk vochtige (V) of normaal vochtige (N) aarde, en uit tomaten, die waren gezaaid in kunstmatig besmetten grond in floatine-potten. De ziektesymptomen van tomaat deden zich als volgt voor: de bladeren verloren hun turgescentie, de randen krulden naar boven om en weldra hing het heele blad slap langs den stengel. In Tabel II is de bladtoestand aangeduid door t = turgescent, geen symptomen en s = slap, duidelijke symptomen. In vele gevallen is van de 5, 7 of 9 blaadjes van een blad de toestand afzonderlijk vermeld op die wijze, dat de bladsteel door een streep wordt voorgesteld, die rechts eindigt in het topblaadje.

Blijkens de tabel kunnen bladeren *Bact. solanacearum* bevatten in steel en schijf, zonder dat eenig ziekteverschijnsel optrad. In slappe bladeren waren de bacteriën in den regel aanwezig, in sommige gevallen echter slechts in geringe hoeveelheid, en ook wel eens ging het turgorverlies niet gepaard met het voorkomen van *Bact. solanacearum*.

Daarna werden slijmzieke tabaksplanten uit den tuin van het Deli Proefstation op dezelfde wijze als tomaat onderzocht. Deze tabak, 1½ — 2 M. hoog en reeds bloemen dragend, was langs natuurlijken weg geinfecteerd. De tabaksbladeren hingen niet alleen slap, maar het weefsel had in vele gevallen de bekende droge, bruine plekken hier en daar langs den rand en in de gedeelten tusschen de zijnerven in; vooral de groote, ovale vlekken, aan één of beide kanten van de hoofdnerf gelegen, waren zeer karakteristiek (Fig. VII). De lange stengels, het groot aantal bladeren en de frappante symptomen maken tabak tot een bij uitstek geschikt studieobject. Heel duidelijk bleek thans, dat tabaksbladeren alle verschijnselen van slijmziekte konden hebben, zonder dat *Bact. solanacearum* werd aangetroffen, noch in den vaatbundel aan den voet van het blad, noch in het weefsel der vlekken. De verschijnselen van één der tabaksplanten zijn in Tabel III vermeld.

Het symptoom der bladverwelking en ontstaan der bruine vlekken wordt dus niet op directe wijze door *Bact. solanacearum* ter plaatse in het leven geroepen. Voor de verschijnselen van de slijmziekte, een tracheobacteriose (de bacteriën leven in de tracheeën of houtvaten), geldt dus niet de verklaring, die VAN DER LEK (24) heeft aangegeven voor de symptomen der tracheomycose van komkommer, veroorzaakt door de schimmel *Verticillium albo-atrum*. Hij vat de Verticilliose in zekeren zin op als een blad ziekte, waarbij de parasiet, de plant binnendringend langs de houtvaten, het bladparenchym aantast.

In de tweede plaats zou men zich kunnen afvragen, of de opvatting van HASKELL (12), dat verwelkingsverschijnselen in een geval van tracheomycose mogelijk toe te schrijven zijn aan wortelaantasting, ook voor slijmziekte geldt. Ofschoon slijmzieke tabaksplanten op het veld meestal eenige bruinzwarte, aan de toppen afgerotte wortels dragen, hebben de infectieproeven met tomaten (§ 1) aangetoond, dat een plant slijmziek kan zijn, zonder dat het wortelstelsel zichtbaar is aangetast.

In de derde plaats dienen we de mogelijkheid onder oogen te zien, dat de wijze, waarop slijmziekte zich openbaart in de bladeren, het gevolg kan zijn van de werking van giftige producten, toxinen, afgescheiden door de bacteriën in de vaten van den stengel en vervoerd naar de bladeren. JOCHEMS (20) en NAKATA (26), schrijven beide het verwelken van slijmzieke tabak aan de inwerking van vergiftige stoffen toe. HUTCHINSON (18) bracht door middel van een lange buis in den stengel van gezonde tabaksplanten de waterige oplossing van het precipitaat, dat hij verkregen

**Tabel II. Verspreiding van *Bact. solanacearum* in de bladeren van kunstmatig geinfecteerde tomaat en de resultaten van het plaatsen der afgesneden stengels in een eosine-oplossing.**

**Table II. Spread of *Bact. solanacearum* in the leaves of artificially inoculated tomato and the results of placing the cut plants in an eosine-solution.**

| Infectie-methode | Aantal daden na de infectie | Bladnummering begonnen aan de stengelbasis | Toestand v/h blad s = slap t = turgescent | Aanwezigheid van *Bact. solanacearum*: Basis hoofdsteel | Aanwezigheid van *Bact. solanacearum*: Bladschijf (sch) of steel der blaadjes (st.) | Kleuring v/h blad door eosine r = rood. lr = lichtrood g = groen llr = zeer lichtrood |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Inoculation method | Number of days after the inoculation | Numbering of the leaves from base to top | Condition of the leaf s = limp t = turgescent | Presence of *Bact. solanacearum*: Base of the principal petiole | Presence of *Bact. solanacearum*: Lamina (sch) or petiole of the leaflets (st.) | Discoloration of the leaf by eosine r = red lr = lightred g = green llr = very light red |
| Wondinf. D wound-inoculation | 2 | 1 | t | + | + sch. | |
| | | 2 | t | + | — sch. | |
| | | 3 | t: topbl. en 2 zijbl. s: 2 zijbl.[1] | + | — sch.<br>— sch. | |
| | | 4 | t | + | — sch. | |
| | | 5 | t | — | — sch. | |
| Wondinf. V | 4 | 1 | geel | — | | g |
| | | 2 | t en s | + | | g |
| | | 3 | s | + (niet veel bact.) | | g |
| | | 4 | t t / t s t | + | | llr llr / g g llr |
| | | 5 | t | + | | topbl. + eene helft zijbl. rood, andere helft l. r. |
| | | 6 | s | + (1 vat) | | helft: rood helft: l. r. |
| | | 7 | t | — | | onderste zijbl: g andere bl.: l.r. |
| | | 8 | t | — | | l.r. |

1) bl = blad = leaf

| Infectie methode | Aantal dagen na de infectie | Bladnummering begonnen aan de stengelbasis | Toestand v/h blad s = slap t = turgescent | Aanwezigheid van *Bact. solanacearum* | | Kleuring v/h blad door eosine r = rood, lr = lichtrood g = groen llr = zeer lichtrood |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Basis hoofdsteel | Bladschijf (sch) of steel der blaadjes (st.) | |
| Inoculation method | Number of days after the inoculation | Numbering of the leaves from base to top | Condition of the leaf s = limp t = turgescent | Presence of *Bact. solanacearum* | | Discoloration of the leaf by eosine r = red lr = light red g = green llr = very light red |
| | | | | Base of the principal petiole | Lamina (sch) or petiole of the leaflets (st.) | |
| Wondinf. V | 4 | 1 | s | | | stengel afgesneden boven bl. 1 |
| | | 2 | s | + | | g |
| | | 3 | t | — | | lr r / r r — r |
| | | 4 | t t / s s — t | + | | lr lr / lr lr — lr |
| | | 5 | s s s / t t t — t | + (één vaatbundelhelft) | | g g g / r r r — lr |
| | | 6 | t | | | r |
| | | 7 | t | | | 1 onderste zijbl. llr. rest r. |
| | | 8 | t | | | r |
| | | 9 | t | | | 2 onderste zijbl. g. |
| | | 10 | t | | | ± g |
| Wondinf. N | 2 | 1 | t | + (middelste vaatb. deel) | | lr. niet omgekruld |
| | | 2 | t | — | | lr „ „ |
| | | 3 | t | + (eenige vaten) | | r „ „ |
| | | 4-7 | t | | | intensief rood (omgekr.) |
| Wondinf. N | 4 | 1 | t s / t s — s | + | + st. van alle 5 bl. | g g / g g — g |
| | | 2 | t | — | | r |
| | | 3 | t | + (enkele vaten) | | r r / g g — r |
| | | 4 | t | | | r |
| | | 5 | t | + (eenige vaten) | | r |
| | | 6 | t | + (éénvaatb. helft) | | één helft : l. r. |

| Infectie methode | Aantal dagen na de infectie | Bladnummering begonnen aan de stengelbasis | Toestand v/h blad s = slap t = turgescent | Aanwezigheid van *Bact. solanacearum* | | Kleuring v/h blad door eosine r = rood, lr = lichtrood g = groen llr = zeer lichtrood |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Basis hoofdsteel | Bladschijf (sch) of steel der blaadjes (st.) | |
| Inoculation method | Number of days after the inoculation | Numbering of the leaves from base to top | Condition of the leaf s = limp t = turgescent | Presence of *Bact. solanacearum* | | Discoloration of the leaf by eosine r = red lr = light red g = green llr = very light red |
| | | | | Base of the principal petiole | Lamina (sch) or petiole of the leaflets (st.) | |
| Grond-inf vóór het zaaien V soil-inoculation before sowing | 32 | 1 | t | | | r |
| | | 2 | s / t — t | | | g / r — r |
| | | 3 | t | | | r |
| | | 4 | t t t / t t t — t | + | + st. g | g lr lr / r r r — r |
| | | 5 | t | | | r |
| | | 6 | t t t t / t t t t — t | | | r r r r / g lr lr r — r |
| Grond-inf. vóór het zaaien V | 32 | 1 | s | + | | g |
| | | 2 | t | + | | lr |
| | | 3 | s s / t t — t | + | | g g / g g — g |
| | | 4 | t t / t t — t | + (eenige vaten) | | g g / lr lr — lr |
| | | 5 | t | | | g |

had door toevoeging van alcohol aan een reincultuur van *Bact. solanacearum* in bouillon. Eenige dagen na die behandeling begon de tabak te verwelken, het eerst aan den top en vandaar naar beneden toe. Een dwarsdoorsnede van den stengel bij het vegetatiepunt toonde aan, dat in de houtvaten gom was gevormd. HUTCHINSON verklaart dat verwelken als volgt. Door protoplasmavergiftiging vermindert de osmotische druk, waardoor de watertoevoer kleiner wordt en de plant gaat verwelken. In latere stadia zou de gomvorming bovendien als remmende factor voor de watertoevoer optreden.

De inwerking der giftige stoffen is dus volgens HUTCHINSON van tweeërlei aard. In de eerste plaats tasten zij de parenchymcellen van het blad aan en in de tweede plaats zijn ze een stimulans tot het vormen van gom in de houtvaten.

Indien *Bact. solanacearum* voor het bladweefsel giftige producten afscheidde, zou m.i., een slap blad van een zieke plant steeds slap moeten blijven, ook als de waterbanen het in staat stelden, overvloedig water op te nemen.

Om dit punt na te gaan, werden van een slijmzieke tabaksplant in het veld een aantal slappe bladeren met typische vlekken in den namiddag geplukt en microscopisch op de aanwezigheid van *Bact. solanacearum* nagekeken. Bij een zevental, dat geen bacteriën in de vaten bevatte, maakte ik onder water een nieuwe snijwond en liet ze daarna een nacht over met den voet in water staan. Den volgenden morgen was al het groene weefsel volkomen turgescent. Dit feit pleit tegen de opvatting van HUTCHINSON, dat bij slijmziekte protoplasmavergiftiging en verminderde turgor oorzaak zouden zijn van een geringen watertoevoer en wijst er meer op, dat verwelken ontstaan is, door het onvermogen der houtvaten om de benoodigde hoeveelheid water aan te voeren.

Indien *Bact. solanacearum* vergiftige producten leverde, was het mogelijk, dat deze in de bouillon-reincultuur in sterke concentratie aanwezig waren. Daarom werd een bouillon reincultuur door een Berkefeld-kaarsje gezogen, waarna in het filtraat afgesneden tomaat-kiemplantjes en tabaksbladeren werden gezet. De contrôle-objecten stonden in gefiltreerden, sterielen bouillon. Na ruim 12 uur was geen noemenswaard verschil te constateeren. Microscopisch werd vastgesteld, dat in dwarscoupes van de tomaat*stengeltjes*, die in het filtraat der bacteriën culturen gestaan hadden, enkele vaatwanden geel gekleurd waren, en in sommige vaten gom gevormd was.

HUTCHINSON verkreeg met de afscheidingsproducten van de bacteriën verwelking. Doch deze trad het eerst aan den top op en dit is bij slijmziekte in natura niet het geval, de bladeren gaan juist van onderen af aan naar boven toe slap worden.

Wat de gomvorming in de vaten betreft, geven mijn voorloopige proeven hetzelfde resultaat als HUTCHINSON meldt. Dus de plant reageert op afscheidingsproducten van *Bact. solanacearum* zoodanig, dat de houtvaatwanden geelbruin verkleuren en gom gevormd wordt.

Er zijn thans vele gevallen van tracheomycosen bekend, waarbij men in staat was, de verwelkingsverschijnselen te voorschijn te roepen, door afgesneden planten of bladeren te zetten in een vloeistof, die afscheidingsproducten van den parasiet bevatte (BEWLEY: 1, BRANDES : 2, FAHMY : 8, HAYMAKER : 13, KUIKARNI en MUNDKUR : 22, PICADO : 30, ROSEN : 31, WHITE : 35).

BEWLEY (1) vermeldt in zijn proeven met Verticillium de bruinkleuring van het hout der tomatenplantjes over 5 c.m. van den stengel, waarin miscrocospisch gom werd waargenomen. Ook ROSEN (31) beschrijft een bruine verkleuring van het xyleem in zijn proeven met Fusarium.

Belangrijk in dit opzicht is de publicatie van HURSH (17). Zijn proeven met filtraten van verschillende schimmelculturen leeren, dat de ouderdom en toestand der stengels factoren zijn, die de snelheid en den graad van verwelking beinvloeden; snel groeiende, sappige stengels verwelken vlugger dan oudere of dan die, welke onder moeilijke omstandigheden zijn opgegroeid. Dit geeft mogelijk een aanwijzing, waardoor in HUTCHINSON'S proeven wel en in de mijne geen verwelking optrad. Wanneer we de resultaten van HURSH in aanmerking nemen, is het begrijpelijk, dat in HUTCHINSON'S proeven verwelking juist het eerst aan den top der tabaksstengels begon op te treden.

Het is nu de vraag, of in de filtraat-proeven met positief resultaat de verwelking der bladeren is toe te schrijven aan een verandering in de waterbanen (verkleuring der houtvaatwanden, gomvorming) of wel aan een vergiftiging van het bladparenchym.

Dit punt heb ik voor de slijmziekte niet nader bestudeerd. De kleine proef met slappe, zieke tabaksbladeren, die door plaatsing in water hun turgescentie terugkregen (blz. 25), duidde op een gebrekkige wateropname in een slijmzieke plant. Er diende nu te worden nagegaan, in hoeverre het watervervoer in een slijmzieke plant verschilde van dat in een gezonde, en of experimenteel zonder bacteriën en zonder toxinen slijmziekte-symptomen konden worden opgewekt.

Thans komt dus de vierde vraag aan de orde, hoe het met het watervervoer in slijmzieke planten gesteld is.

Om hier eenig idee van te krijgen, werden de stengels van slijmzieke tomaat en tabak onder water afgesneden en in een eosineoplossing geplaatst. De roode vloeistof steeg in de houtvaten op en kleurde de bladeren. Reeds na een paar uur was de eosine in den top der tomaten doorgedrongen. De tabaksstengels van 1½ — 2 M. lengte bleven een nacht over in de oplossing staan. Het bleek nu, dat bepaalde bladeren of bladdeelen, die in loodrechte richting boven elkaar aan den stengel geplaatst waren, zich niet of slechts weinig rood kleurden. Die bladreeksen correspondeerden met ongekleurde longitudinale strooken hout van den stengel. De rangschikking der tabaksbladeren langs den stengel is zoodanig, dat zij om de acht loodrecht boven elkaar staan. Vandaar dat in Tabel III de 24 bla-

deren verdeeld zijn in 8 verticale rijen van telkens 3 bladeren. Een matig slijmzieke tabaksplant had b.v. 6 gezonde, rood gekleurde bladreeksen (2, 10, 18; 3, 11, 19; 5, 13, 21; 6, 14, 22; 7, 15, 23; 8, 16, 24) en 2 reeksen, die slechts weinig eosine hadden opgenomen (1, 9, 17 en 4, 12, 20) en waarvan de onderste bladeren de slijmziektesymptomen vertoonden.

Eén gezonde en twee slijmzieke tabaksstengels, welke van 's middags 5 uur tot den volgenden morgen 8 uur gelegenheid hadden eosine op te zuigen, werden daarna ontschorst (Fig. VI). De gezonde stengel (rechts) was over de geheele lengte van 1,65 m. vuurrood gekleurd. De stengel van een hevig zieke plant (links), had een streperige rose tint tot een hoogte van 70 c.m., de rest (55 c.m.) was ongekleurd. Aan den 1.57 m. langen stengel van de matig zieke plant was aan één kant van den top een smal lichtrood streepje zichtbaar, voor de rest bestond de houtzuil uit afwisselend roode en witte banden.

De vermindering van het watervervoer in slijmzieke planten is aanzienlijk. Een gezonde tabaksstengel zoog b.v. 130 cc eosineoplossing op in 24 uur, een zieke 10 cc in denzelfden tijd.

De microscopische dwarsdoorsneden van het hout der stengels gaven het volgend beeld. In de gezonde plant waren de wanden van alle houtvaten intensief rood gekleurd, bacteriën ontbraken ten eenenmale. Daarentegen konden in de matig zieke tabak slechts enkele roodgekleurde vaatwanden worden waargenomen en was een groote hoeveelheid bacteriën in de vaten aanwezig. In het laatste geval hadden de houtparenchymwanden een veel gelere tint dan in het eerste geval.

In Tabel II en III zijn de resultaten der proeven over het watervervoer in slijmzieke planten vermeld naast de gegevens over de verspreiding van *Bact. solanacearum* in de bladeren. Zij leeren ons, dat de eosineoplossing in slappe, zieke bladeren niet of zeer weinig doordringt. In de diverse dwarsdoorsneden van stengels en bladstelen vielen de met bacteriën gevulde vaten direct in het oog als ongekleurde plekken temidden der gezonde roodgekleurde vaten. Eosine was dus een uitstekend negatief kleurmiddel, om de aanwezigheid van *Bact. solanacearum* aan te toonen.

Het voorkomen van *Bact. solanacearum* in de stengelhoutvaten maakt dus, dat langs deze vaten geen direct watervervoer plaats vindt. Indien men den top van een zieken, weinig vloeistof opzuigenden tabaksstengel afsnijdt en opnieuw in een eosine-oplossing zet, geleidt het bateriën-vrije hout de vloeistof uitstekend. De groene deelen der slappe, zieke bladeren krijgen de turgescentie terug

**Tabel III. Verspreiding van *Bact. solanacearum* in de bladeren van een slijmzieke tabaksplant (natuurl. inf.) en de resultaten van het plaatsen van den afgesneden stengel in een eosine-oplossing.**

**Tabel III. Spread of *Bact. solanacearum* in the leaves of a slime-diseased tobacco-plant, inoculated in a natural way, and the results of placing the cut plant in an eosine-solution.**

| Bladnummering begonnen a/d stengelbasis | Toestand van het blad s = slap t = turgescent v = vlekken | Aanwezigheid van *Bact. solanacearum* i/d bladbasis | Kleuring v/d vaatbundelboog i/d bladbasis g = groen r = rood lr = lichtrood | Kleuring van het blad g = groen r = rood lr = lichtrood |
|---|---|---|---|---|
| Numbering of the leaves from base to top | Condition of the leaf s = limp t = turgescent v = spots | Presence of *Bact. solanacearum* in the base of the leaf | Discoloration of the xylem in the base of the leaf g = green r = red lr = light red | Discoloration of the leaf g = green r = red lr = light red |
| 1 | verdord | + | g (een enkel vat r) | |
| 9 | s en v | — | l r | l r |
| 17 | t | | | |
| 2 | afgevallen | | | |
| 10 | s en v | + | l r | |
| 18 | t | — | l r (éénzijdig) | l r (éénzijdig) |
| 3 | s en geel | + | l r | r (a/d basis) |
| 11 | s en v | — | l r | |
| 19 | t | | g | g |
| 4 | s en geel | + (1 klein plekje) | g | g |
| 12 | s en v | — | l r | Bladhelft met vlekken is a/d basis lr, bovenaan g, andere bladhelft lr |
| 20 | t | | l r | |
| 5 | s en v | + | rood i/d hoek v/d gezonden bladkant | Basis r, verder g |

| Bladnummering begonnen a/d stengelbasis | Toestand van het blad s = slap t = turgescent v = vlekken | Aanwezigheid van *Bact. solanacearum* i/d bladbasis | Kleuring v/d vaatbundelboog i/d bladbasis g = groen r = rood lr = lichtrood | Kleuring van het blad g = groen r = rood lr = lichtrood |
|---|---|---|---|---|
| Numbering of the leaves from base to top | Condition of the leaf s = limp t = turgescent v = spots | Presence of *Bact. solanacearum* in the base of the leaf | Discoloration of the xylem in the base of the leaf g = green r = red lr = light red | Discoloration of the leaf g = green r = red lr = light red |
| 13 | s | — | 2 hoekpunten r | l r |
| 21 | t | | stukje rose | g |
| 6 | s en v | — | Buitenkant r Binnenkant g | l r |
| 14 | s en begin v | — | l r | ± g |
| 22 | t | | g | g |
| 7 | geelbruin | + | ± g | g |
| 15 | s | + | l r | |
| 23 | t | — | g | |
| 8 | s | + | ± r | r |
| 16 | t | — | | |
| 24 | t | | g | |

en kleuren zich intensief rood.

Op welke wijze beinvloeden de bacteriën in de houtvaten van een tabaksstengel den waterstroom? Verscheidene auteurs zoeken de verklaring der verwelkingsverschijnselen in een verstopping der houtvaten door de bacteriën (GARNER, WOLF & MOSS : 9, GROENEWEGE : 10, HUNGER : 16, JANSE : 19). HUTCHINSON (18) wijst op de gomvorming, die tot thrombose der vaten aanleiding kan geven. JOHNSON (21) meent, dat de bacteriën de vaten verstoppen of op andere wijze aantasten, zoodat de toevoer van water en voedsel wordt belemmerd.

De verstoppingstheorie is in vele publicaties over tracheobacteriose en tracheomycose vervangen door de reeds besproken toxinen-theorie. Het wil mij voorkomen, dat voor het phytopathologisch verwelkingsproces de factoren, in verschillende theorieën aangegeven, gezamenlijk werkzaam zijn.

De beschreven eosine-proeven wijzen er op, dat de bladeren van een slijmzieke plant slap hangen door watergebrek. *Bact. solanacearum* veroorzaakt dus een toestand, dien men zou kunnen

noemen „physiologische droogte”, een term, dien MAC MILLAN (25) gebruikte bij een geval van tracheomycose. Voor het ontstaan van het watertekort kunnen vele factoren een rol spelen: wortelaantasting, ophooping van bacteriën in de vaten, inwerking van door de bacteriën afgescheiden stoffen op de houtelementen, waardoor de houtvaatwanden geelbruin verkleuren en in de vaten gom gevormd wordt.

In vele gevallen van tracheobacteriose en tracheomycose vinden we als symptomen, behalve het verwelken, ook het achterblijven in groei aangegeven. Verstoorde water- en voedseltoevoer maakt dit tweede verschijnsel zeer plausibel. De toxinen-theorie heeft zich tot dusver beperkt tot de bladverwelking.

Na mijn vertrek uit Medan las ik in de pas verschenen publicatie van HURSH (17), dat de waarnemingen over tracheomycosen hem gebracht hadden tot de volgende uitspraak: „Observations do not seem to support the hypothesis that pathologic conditions such as yellowing and wilting are due to fungous products directly transported to the leaves”. Dat het houtgedeelte op abnormale wijze werkt, kan volgens HURSH mogelijk worden toegeschreven aan schadelijke stoffen, afgescheiden direct door den parasiet of ontstaan door het afsterven van hospescellen. Als eindconclusie van zijn proeven meldt hij: „The reaction of plant stems to fungous filtrates indicates an interference with the normal functioning of the water-conducting system”.

Het watergebrek leidt tot slap worden der bladeren. Hoe zijn echter de eigenaardige vlekken der slijmzieke tabaksbladeren te verklaren?

### § 5. Invloed van uitwendige factoren op het ontstaan der slijmziektesymptomen in het blad bij tabak.

Toen de proeven met eosine er op wezen, dat de inwendige factor „slechte watergeleiding in bepaalde houtvaten van den stengel” een voorname rol bij het optreden der slijmziektesymptomen speelt, werd de uitwerking van een kunstmatige storing van den waterstroom in gezonde planten nagegaan. Dit geschiedde door een dusdanige operatie van tabaksplanten, dat kleine rechthoekige stukjes van den houtcylinder werden uitgesneden.

Verschillende methoden vonden toepassing. Het verwijderen van dergelijke houtstukjes aan één, vier of aan acht kanten van den stengel had weinig resultaat. De bladeren bereikten daarmee niet dien graad van slapheid, die kenmerkend is voor slijmzieke

planten. Meer succesvol was de operatie in den stengel vlak onder verschillende bladeren. Ook werden de bladeren van sommige planten aan de basis in de hoofdnerf éénzijdig uitgehold, zoodat een groot deel der houtvaten buiten werking was gesteld. Deze methode had het groote bezwaar, dat de bladeren op de verwondingsplek nog al eens afbraken. De proefobjecten waren groote, gezonde tabaksplanten in den tuin van het Deli Proefstation. De bloeitoppen werden vooraf verwijderd. Na de verwonding gingen de bladeren in meerdere of mindere mate slap hangen. Door krachtige inwerking van de tropenzon kreeg het slappe weefsel tusschen de zijnerven een lichtgroene tot geelgroene tint; soms droogde het bruin op. Die verbleeking van het bladparenchym is typisch voor slijmziekte.

Een paar dagen na de operatie werden eenige bladeren waargenomen, die de karakteristieke droge plekken vertoonden, zooals die voor slijmzieke tabak beschreven zijn. Men vergelijke Fig. VII en Fig. VIII. Toevallig had het na de operatie hevig gewaaid. Welke waarde hieraan was toe te kennen, zou mij pas later duidelijk worden.

Dezelfde slijmziekteverschijnselen ontstonden aan afgesneden gezonde tabaksstengels, die met een verschroeid snijvlak in een flesch water op een open terrein waren geplaatst. Het afsluiten der vaten aan het snijvlak namelijk met paraffine bleek dikwijls onvoldoende, daarom werd de stengelbasis een poos in de vlam gehouden. Het kostte werkelijk moeite tabaksstengels tot verwelken te brengen.

Het voortdurend vergelijken der symptomen van slijmzieke en geopereerde gezonde planten leidde tot een nauwkeuriger waarnemen der ziekteverschijnselen. Het viel nu op, dat de vlekjes vrij regelmatig verspreid waren. Ze liggen in strooken, die evenwijdig aan de zijnerven loopen, terwijl de groote, ovale vlekken, vlak naast de hoofdnerf gelegen, een of twee rijen parallel aan de hoofdnerf vormen. Aan den bovenkant van het blad werden met de loupe fijne, zwart gespikkelde streepjes tusschen de vlekjes in en aan den rand ervan waargenomen. Deze lijntjes aan de scherpe bocht van de groote, ovale vlekken liepen evenwijdig aan de hoofdnerf. In de strooken ziek weefsel tusschen de zijnerven was hun richting parallel aan deze laatste, terwijl de streepjes op de aangetaste plekken aan de bladranden zoo kris-kras dooreen lagen, dat van geen bepaalde richting sprake was. Het bladweefsel aan den onderkant vertoonde vele groepjes en bij doorvallend licht had het blad hier en daar doorschijnende plekjes.

Zouden al deze verschijnselen misschien ontstaan zijn door kneuzingen van het bladparenchym en zou de wind daarbij een voorname rol gespeeld hebben ?

Deze veronderstelling voerde tot een reeks proeven, waarin gezonde, door drogen in de zon slap gemaakte bladeren in de hand krachtig heen en weer werden bewogen. Na 5 à 10 minuten waren de donkere groefjes op de lichtgroene bladonderzijde, de zwarte lijntjes aan den bladbovenkant en de kneuzingsplekjes bij doorvallend licht duidelijk zichtbaar tusschen de zijnerven in en hier en daar aan den bladrand. Eenige bladeren werden met de basis in vloeibare was gedompeld en, nadat een klein sneetje in het korstje was aangebracht, buiten in een fleschje water in de zon gezet. Aldus bleef een zekere graad van slapheid bewaard. Andere bladeren ondergingen deze behandeling niet, verkregen hun turgescentie terug, werden later opnieuw in den slappen toestand gebracht, nogmaals heen en weer geschud en daarna in water in de zon geplaatst. In beide gevallen droogde het weefsel der kneuzingsplekken op tot droge vlekjes en ontstonden de typische slijmziekte-symptomen.

Het heen en weer schudden gedurende 20 minuten van gezonde tabaksstengels, waarvan de bladeren door drogen in de zon hun turgor hadden verloren, leidde tot dezelfde resultaten. Op stengels met turgescente bladeren had het waaien geen invloed; alleen in enkele gevallen onstonden scheurtjes in het weefsel. De stengels werden na den „imitatie-storm" aan het snijvlak geschroeid en in het open veld in een flesch water gezet. In de zon droogden de kneuzingsplekken op en de bladeren kregen de slijmziektesymptomen.

Hoe slapper het blad was, des te grooter beschadiging de wind veroorzaakte.

Toen het op zekeren middag slecht, stormachtig weer was, ben ik onmiddellijk nadat de wind was gaan liggen, de echt slijmzieke tabaksplanten in den proeftuin van het Deli Proefstation gaan nakijken. Vele bladeren vertoonden precies dezelfde verschijnselen, als die, welke door kunstmatige windwerking verkregen waren. De kneuzingsplekjes waren toen nog niet door de zon opgedroogd. Bovendien viel het op, dat verschillende bladeren met de slappe randen naar boven waren omgeslagen. Dit gaf een aanwijzing voor het ontstaan der ovale vlekken langs de hoofdnerf. Het heen en weerklappen der bladhelften om de hoofdnerf als as zal leiden tot overlangsche groeven en kneuzingen. In Fig. VIII is bovenaan rechts een basale slip van een tabaksblad met typische

vlekken afgebeeld. Deze ontstonden door het wegsnijden van een stukje hout in den stengel schuin onder het blad aan den kant van genoemde slip. Alleen dit basale bladstuk ging slap hangen en op de buigingsplaats langs de hoofdnerf vormden zich groeven en kneuzingsplekken, welke tot bruine vlekken opdroogden.

Dit leidt dus tot de conclusie, dat de uitwendige factoren zon en wind bij slappe tabaksbladeren, die den turgor door watergebrek hebben verloren, een typische „slijmziekteaantasting" in het leven roepen. De zon verbleekt het bladweefsel tusschen de zijnerven in en doet de kneuzingsplekken, door den wind ontstaan, opdrogen tot bruine vlekken.

Vatten we § 4 en § 5 samen, dan wijzen de proeven er op, dat bij een slijmzieke tabaksplant de bladeren gaan slap hangen door watergebrek, en de verkleuring en vlekken onstaan door de werking van zon en wind. Welke mechanische en chemische factoren bij het ontstaan van het watertekort een rol spelen en op welke wijze de bladcellen door zonbestraling en storm beschadigd worden, zijn vraagpunten, die slechts door nader onderzoek beantwoord kunnen worden.

HUNGER (16), die de typische slijmziektesymptomen van tabaksbladeren vrij nauwkeurig weergeeft, heeft de bladvlekken microscopisch bekeken en vermeldt: „De celwanden zijn opgelost en de bladgroenkorrels geheel gedesorganiseerd."

In de paragrafen 1, 2 en 3 is uitgewerkt, hoe zeer ruime vochtvoorziening de ontwikkeling van *Bact. solanacearum* in de hand werkt en het verloop van de slijmziekte-aantasting versnelt. Uit de 4e. en 5e. paragraaf valt op te maken, dat droogte de slijmziektesymptomen sterk te voorschijn doet komen en daardoor het verlies te velde dus groot zal zijn.

## § 6. Korte samenvatting der resultaten.

*a.* (§ 1, 2 en 3). De infectieproeven met *Bacterium solanacearum* in tomaat leerden, dat

1o. het slijmziekteproces door een groot watergehalte van den bodem versneld wordt,

2o. *Bact. solanacearum* zich in de vaten van vochtig gehouden planten veel sterker ontwikkelt dan in de vaten van planten, welke in drogen grond groeien.

Het bleek, dat de bacteriën in de houtvaten a.h.w. zuilvormige massa's vormen, die steeds langer worden en zich vertakken, wanneer zijbanen (bladstelen of zijwortels) dit mogelijk maken.

Op kunstmatige voedingsbodems wordt *Bact. solanacearum* in haar groei belangrijk vertraagd, wanneer weinig vocht beschikbaar is. Deze groote behoefte aan vocht is mogelijk één van de oorzaken, waarom de bacteriën zich veel sterker ontwikkelen in planten, die veel water opzuigen dan in die, waarin een veel geringere hoeveelheid vocht aanwezig is.

*b.* (§ 4 en 5.) Verschillende proeven met tabak en tomaat leerden, dat de bladeren van een slijmzieke plant verwelken door watergebrek.

De plant reageert dusdanig op afscheidingsproducten van *Bact. solanacearum,* dat de houtvaatwanden geelbruin verkleuren en gom in de vaten gevormd wordt. Mogelijk spelen de door den parasiet afgescheiden stoffen op die wijze een rol bij het ontstaan van de z.g. „physiologische droogte" in een slijmzieke plant.

Het optreden van bruine, droge vlekken aan één of twee kanten van de hoofdnerf, tusschen de zijnerven en hier en daar aan den bladrand van bladeren eener slijmzieke tabaksplant, is te verklaren door de werkzaamheid van de uitwendige factoren, wind en zon, op door den inwendigen factor, watergebrek, slap geworden bladeren.

Krachtig heen en weer schudden van gezonde, door watergebrek slap geworden tabaksbladeren doet eigenaardige kneuzingsplekjes in het weefsel ontstaan, die in de zon opdrogen tot de bekende droge vlekken van slijmziekte tusschen de zijnerven en aan de bladranden. Op dezelfde wijze is het optreden van ovale vlekken langs de hoofdnerf te verklaren door hevige windvlagen, die de slap omlaag hangende bladeren doen omklappen naar boven langs lijnen evenwijdig met de hoofdnerf loopend.

*c.* In de resultaten onder a en b vermeld zou men mogelijk respectievelijk aanwijzingen kunnen vinden voor een verklaring van de waarnemingen uit de practijk: a. bevordering van het slijmziekteproces door hoogen grondwaterstand en overvloedigen regenval en b. groot verlies aan product bij sterke droogte.

Aan het slot van deze mededeeling zij het mij nog vergund, mijn hartelijken dank te betuigen:

aan de International Education Board, die mij in staat stelde een studiereis naar Indië te maken,

aan de Deli Plantersvereeniging, die mij gastvrijheid in het Deli Proefstation te Medan verleende,

aan de heeren Dr. J. KUIJPER, Directeur van het Deli Proefstation en Dr. S. C. J. JOCHEMS, Onder-Directeur, van wie ik steun en advies bij mijn werk mocht ontvangen,

aan het Deli Proefstation-personeel en de heeren administrateurs en assistenten, die mij op de een of andere wijze bereidwillig ter zijde stonden.

Wageningen, April 1929.

## ENGLISH ABSTRACT

---

# THE INFLUENCE OF THE DEGREE OF SOIL-HUMIDITY ON THE SLIME-DISEASE, CAUSED BY BACTERIUM SOLANACEARUM E. F. S.

by

**Dr. J. H. H. VAN DER MEER,**

Botanist at the Institute for Phytopathology, Laboratory for Mycology and Potato Research, Wageningen, Holland.

### Introduction.

During the period from December 1927 to August 1928 I worked as „fellow" of the „International Education Board" [1]) at the Deli Experiment Station in Medan (Sumatra).

The observations in the tobacco-fields, as well, in Deli as elsewhere, teach, that humidity of the soil is an important factor for the matter of slime-disease and is working in two ways.

1o. A soil that is in a very humid condition, either caused by a high level of the groundwater or by continual rains, favours the slime-disease (VAN BREDA DE HAAN : 3, GARNER, WOLF & MOSS : 9, HUNGER : 16, JOHNSON : 21, PALM : 27 and 28, SMITH : 32, SMITH & GODFREY : 33, UYEDA : 34).

For this reason the Deli Experiment Station advises the planters to drain their fields thoroughly.

2o. Tobacco-plants attacked by *Bacterium solanacearum* are killed rapidly in a period of long drought, so that the total loss of product can be very great in years of drought (COOK : 7, VAN HALL : 11, HUNGER : 16, JOHNSON : 21, SMITH & GODFREY : 33).

In this connection Dr. J. KUIJPER, Director, and Dr. S. C. J. JOCHEMS, Under-Director of the Deli Experiment Station, advised me to study experimentally the influence of the degree of soil-humidity on slime-disease and to try to explain the observations in some way.

---

[1]) Since Jan. 1st 1929 „Rockefeller Foundation".

## § 1. Inoculations with tomato at different degrees of soil-humidity.

**Methods.**

The experimental work was carried out with tomatoplants, because they show very rapidly the symptoms of slime-disease. The seedlings, cultivated in disinfected soil, were planted four to a pot. These pots, previously disinfected with a solution of ½% potassium permanganate, contained 6 K. G. soil, which had been heated to 70° C according to the box and grid method.

The pots were divided into three groups. The first one was watered as little as possible, the second one in a normal way and the third one received an extraordinarily large quantity of water, All pots of the same group received the same quantity of water, measured in a measure-glass. The pots of the third group had at their outside a layer of „floatine", so that the water could not evaporate through the porous walls. At the bottom of these pots an opening was left; the surplus of water streaming through that hole was not lost, for the pots were standing on little plates.

In all experiments tap-water was used, so that infection by watering was impossible. The pots were placed on a rack out of doors at one side of the building under a shed. The plants were watered in such a way, that the tomatoes of the first group received exactly enough for keeping their turgescence, those of the second group developed normally and those of the third group grew very rapidly.

In all experiments the tomato-plants were inoculated with a pure culture of *Bacterium solanacearum* in beef broth, which was only two days old. The parasite was isolated in January 1928 from a diseased tobacco-plant, found in the fields of the Deli Experiment Station. Besides the three groups of tomatoes also a number of little tobacco-plants in pots were inoculated, in order to keep the strain of *Bacterium solanacearum* virulent. After some time the bacteria were reisolated from those tobacco-plants. In this way I inoculated and reisolated fourteen times. So the strain, used every time in the experiments, did not lose its virulence.

Half of the number of the pots were controls. They were treated in a same way, only without adding *Bact. solanacearum.* Usually there were 12 inoculation- and 12 control-pots, each of the 3 groups consisting of 4 pots, i.e. 16 plants.

The five following methods of inoculation were used:

1o. the pots were filled with soil of a field, where tobacco was heavily diseased,

2o. by bringing into the stem by means of a needle a little drop of the beef broth-culture,

3o. by adding to the soil ± 20 cc beef broth-culture before planting the seedlings into the pots (the controls received the same quantity of sterilized beef broth),

4o. by watering the already transplanted seedlings in the pots with a mixture of 20 cc beef broth-culture and 100 cc water, the controls received 20 cc beef broth and 100 cc water (during the first five days after transplanting all plants were watered in a normal way, probably the wounds of the roots caused by transplanting recovered in that period),

5o. by inoculating the soil of the pots before sowing (details as in method 3).

**Results.**

In all five experiments the results were the same. In the third group, thus in the abundantly watered pots, the largest number of diseased plants occurred and in the first one (scarcely watered pots) the smallest number (Fig. II, III, IV). That means: soil-humidity favours slime-disease.

Besides the following observations were made.

The roots of the tomatoes of the third group, growing in a very wet soil in the floatine-pots were not decayed, but looked quite healthy (Fig. I and V). Evidently root-rot is not necessary for the occurence of slime-disease. These observations contradict the statement of GROENEWEGE (10), that slime-disease is introduced by root-rot.

The first symptoms of slime-disease appeared as rapidly in experiment 3 as in experiment 4. In the first case transplanted seedlings with wounded roots were placed in inoculated soil, in the second case seedlings with recovered roots were watered with a bacterium-culture.

In experiment 5 tomato was sown in the pots with inoculated soil. Afterwards the plants became diseased.

It is not probable, that the roots of the plants in experiments 4 and 5 would be heavily injured by the beef broth. This leads to the conclusion, that *Bacterium solanacearum* can penetrate roots, which are not artificially heavily injured. It does not agree with GROENEWEGE'S (10) statement that a small root damage of healthy, vigorous plant is not sufficient to cause slime-disease, though a large quantity of *Bact. solanacearum* is added to the soil. He experimented with *Arachis hypogaea.*

### § 2. Spread of Bacterium solanacearum in the stem of tomato after wound-inoculation at different degrees of soil-humidity.

The experiments of § 1 concern the influence of soil-humidity on the external symptoms of slime-disease. After that the behaviour of the parasite within the hostplant had to be studied.

**Methods.**

Tomato-seedlings cultivated in disinfected soil were transplanted to pots with 6 K.G. ditto soil (4 to a pot and watered with an equal, normal quantity of tap-water. When they had developed rather long stems, they were ready for the experiment. Some days before inoculation the pots were divided into two groups D and V. Pots D („droog" = dry) did not receive more water than necessary to keep plants turgescent, pots V („vochtig" = humid) were watered abundantly. Always a measure-glass was used in order to add an exact quantity of water. The tomatoes were inoculated by pricking the stem with a needle, bearing a drop of beef broth-culture. Care was taken to have drops as equal as possible, so that the plants received about the same quantity of bacteria. During two till five days after inoculation the pots of the two groups were watered as before.

At the same time tomato plants in dry and humid condition were studied, concerning the spread of bacteria up and down in the vessels of the stem. In the beginning press-juice of little pieces of the stem was introduced with a needle into the stem of healthy tomato-seedlings. If these plants showed slime-disease after some days, it meant that the inoculation-juice contained bacteria. Afterwards the presence of bacteria was studied microscopically in sections at different heights of the stem and the root.

**Results.**

The results of the expriments are stated in Table I. Successively 18 groups each consisting of two tomato-plants D and V were inoculated. After 2 — 7 days a tomato in dry and one in humid condition were both studied, concerning the spread of the bacteria up and down in the vessels of the stem. In the 3rd, 4th, 5th and 6th column this spread of the bacteria is indicated in c.m. The letter (t) means, that the top of stem or root was reached. In the last two columns the relation of the quantities of water given to the pots D and V before and after inoculation is stated.

The experiments proved, that *Bact. solanacearum* developed much more vigorously in the tomatoes, which were watered abundantly than in those, which received only a small quantity of water. The bacteria spread from the inoculation-wound along the vessels up to the stem and down to the root. In the plants V they reached very soon the top of stem and root and the symptoms of disease appeared quickly. The bacteria developed slowly in the tomato-plants D, sometimes they were only found directly above and under the inoculation-wound. The tomatoes D did not show wilting at all or only to a slight degree.

In relation to these results the experience of SMITH (32) is interesting: „In general, infections have been more successful in young, rapidly growing, soft, watery plants than in slow-growing woody ones or in mature ones".

A drop of eosine-solution, brought into a healthy tomato-plant by means of a needle, reddened all leaves of the plant at that side of the stem after an hour. *Bact. solanacearum* does not spread in this way, for in that case the parasite had to be found abundantly some days after inoculation up to the top of the plant and in all leaves at the infection-side. However the experiments taught, that the bacteria in the vessels form column-like masses, which lengthen at both sides and branch when lateral ways (leaf-petioles or lateral roots) make such possible.

*Bact. solancearum*, probably transported a little by the negative pressure in the tracheae, may crowd on along the vessels by multiplication and by active movement.

Thus the parasite develops much better in heavily watered than in scarcely watered tomato-plants. Will the vigorous development of the bacteria be due to the large quantity of water, that is at their disposal? In order to answer this question, the following experiments were taken.

### § 3. Growth of Bacterium solanacearum on dried and undried agar-plates.

*Bacterium solanacearum* was cultivated in Petri dishes on beef broth-agar 2% and on bouillon-pepton-agar 2%. Some of the plates were dried by heating the Petri dishes carefully above a flame. At the surface of the plates little drops of water, which after cooling the Petri dishes condensed against the cover. A repeated drying of the cover and heating of the plates caused at last quite a dry surface of the agar-media.

In every experiment an equal quantity of bacteria, namely a platinum-loop, was spread over the surface of the plates.

After two days the untreated plates showed a large number of colonies, whereas on the dried plates no, or only some colonies had developed. Some days later the same difference in growth was observed.

Thus a luxuriant growth of *Bact. solanacearum* on artificial media is prevented by a deficit of water. This need of water may be one of the causes, why the parasite develops more vigorously in plants growing in humid soil than in those growing in dry soil.

### § 4. Influence of internal factors on the development of slime-disease symptoms.

Many theories are suggested concerning the wilting of plants, attacked by fungi or by bacteria, which live in the vessels of their hostplant. Such diseases are called tracheo-mycoses and tracheo-bacterioses. In this paragraph the different theories will be examined in relation to slime-disease, a tracheo-bacteriosis.

1. According to VAN DER LEK (24) wilt of cucumber, caused by the fungus *Verticillium alboatrum*, is apparently a leaf-disease; the parasite reaches the leaves along an internal way, through the vessels of root and stem. Arrived at the place of its destination, the fungus attacks the parenchymatic tissue.

Has slime-disease to be explained in the same way?

The spraed of *Bact. solanacearum* in the leaves of a diseased plant was studied in tomato and tobacco. The observations are stated in Table II and Table III. The tomatoes are already mentioned in the experiments described in former chapters. Some of them had been inoculated by needle-pricks and had grown in dry (D), wet (V) or normal humid soil (N), others were sown in inoculated soil in „floatine-pots". The tobacco-plants grew in the experimental garden of the Deli Experiment Station, they had a height of 1½ — 2 M, and were infected in a natural way. The condition of the leaves is indicated in the tables as: t = turgescent and s = limp, whereas in Table III, V means spots. The symptoms of a diseased tomato-leaf are: loss of turgor, curling of the margins upward and then drooping. The different leaflets do not show these symptoms always at the same time. Therefore diagrams are used in Table II. A horizontal stripe represents the principal petiole with its base at the left and its top at the right. The condition of each of the 5, 7 or 9 leaflets is stated separately by the letters.

The symptoms of a diseased tobacco-leaf are: loss of turgor, sagging down of the margins, often getting brown oval patches at one or both sides of the midrib, and dry spots between the lateral veins and here and there at the margin (Fig VII).

The study of the tomato-leaves showed:

that leaves can be turgescent, though *Bact. solanacearum* is present in petiole or lamina,

that limp leaves generally contain the parasite, in some cases however only in small numbers,

that sometimes the loss of turgescence is not accompanied by the presence of *Bact. solanacearum.*

The study of the tobacco-leaves taught, that all symptoms of slime-disease can occur in spite of the absence of the parasite in the tissue of the spots and in the vessels at the base of the leaf.

Thus *Bact. solanacearum* does not cause the symptoms of slime-disease in a direct way.

2. HASKELL (12) attributes the wilt-symptoms of a tracheomycosis to root-attack.

In the case of slime-disease it is true, that infected tobacco-plants of the field very often have some roots with decayed tops. However the inoculation-experiments with tomato (§ 1) showed, that slime-disease can occur in spite of a healthy-looking root-system.

3. In literature very often the theory of toxic substances is suggested. Many authors (BEWLEY : 1, BRANDES : 2, FAHMY : 8, HAYMAKER : 13, KULKARNI & MUNDKUR : 22, PICADO : 30, ROSEN : 31, WHITE : 35) succeeded in producing wilt-symptoms of tracheo-mycoses by placing cut plants or leaves in fungous filtrates.

As for slime-disease of tobacco JOCHEMS (20) and NAKATA (26) both attribute the symptoms to the influence of poisonous substances. HUTCHINSON (18) fed healthy tobacco-plants by means of a long tube with the watery solution of the precipitate, that appeared after adding alcohol to a pure culture of *Bact. solanacearum* in beef broth. After some days the plants developed wilt, beginning at the top. A cross-section of the growing-point of the stem showed the occurrence of gum within the vessels. HUTCHINSON considers the wilting to be due to the interference of osmotic pressure consequent on protoplasmic intoxication and in the advanced stages the water supply is interfered with by the formation of gum masses in vessels.

If *Bacterium solanacearum* secreted substances, which poi-

soned the parenchymatic cells of the leaves, in my opinion a limp leaf had to persevere in its condition, when the vessels were experimentally enabled to transport water. In order to study this, the wilted and spotted leaves of a diseased tobacco-plant in the field were gathered in the afternoon. Miroscopical cross-sections were made of the leafbases. Seven of the leaves without any bacteria were placed in water and cut anew under the liquid. The following morning all green tissue was quite turgescent. This observation suggests, that the inability of the xylem in the stem to transport sufficient water to the leaves has caused wilting, and contradicts the explanation of HUTCHINSON, that the wilting symptoms of slime-disease would have been caused by protoplasmic intoxication and decreased osmotic pressure.

Also some temporary experiments were taken by placing cut tomato-seedlings and tobacco leaves in the filtrate of beef broth-cultures of *Bact. solanacearum*. In the same way controls were treated with sterile beef broth. After ± 12 hours there was no wilting to be observed, but cross-sections of the tomato stems from the bacterial filtrate showed, that the walls of some vessels were discoloured yellow and that some vessels contained gum. Thus concerning the influence of the secreted substances on the xylem-elements there is agreement with the results of HUTCHINSON. However this author observed wilting too. But the wilt-symptoms, produced experimentally, began to develop at the top and from there downward, that means quite in an opposite direction to those of slime-disease.

Very interesting in this respect is the publication of HURSH (17), which I read after my departure from Medan. This author states „that the age and condition of the plant stems are factors that greatly influence their wilting response when placed in fungous filtrates and that rapidly growing, succulent stems will wilt more quickly than older stems or stems grown under hardening conditions".

Possibly the factors mentioned by HURSH (17) indicate the reason, why in HUTCHINSON'S experimetns wilting appeared first at the top and why my experiments did not result in wilt symptoms.

The question is whether wilting of the leaves in the filtrate-experiments is due to an intoxication of the parenchymatic tissue or to a deficit of water caused by an injuring of the xylem-elements (discoloration of the walls of the vessels and formation of gum), so that the vascular system does not function in a normal way.

BEWLEY (1) and ROSEN (31) both mention, that the wilted plants from the fungous filtrates showed a brown discoloration of the xylem.

HURSH (17) states: „Observations do not seem to support the hypothesis that pathologic conditions such as yellowing and wilting are due to fungous products directly transported to the leaves". As final conclusion of his experiments he says: „The reaction of plant stems to fungous filtrates indicates an interference with the normal functioning of the water-conducting system".

4. According to the oldest theory wilting is due to a mechanical clogging of the vessels. (CARNER, WOLF & MOSS:9, GROENEWEGE : 10, HUNGER : 16, JANSE : 19). HUTCHINSON (18) suggests in the case of slime-disease of tobacco, that afterwards the water supply may be interfered with by the formation of gum masses in the vessels. JOHNSON (21) considers, regarding the same disease, that the bacteria clog or otherwise injure the vessels, so that the water and food supplies are cut off and the plant naturally wilts and gradually dies.

In order to get some idea of the water supply in plants, attacked by *Bact. solanacearum,* the following experiments were made. Inoculated tomatoes of the already described experiments and infected tobacco (high 1½ — 2) from the fields of the Deli Experiment Station were cut under water and placed in an eosine-solution. Afterwards cross sections of stem and leaf-bases were studied microscopically. The results are stated in Table II (last column) and Table III (last two columns). The plants showed in longitudinal direction rows of reddened and rows of unreddened leaves or leaf-parts. The eosine ascended in the healthy parts of the vascular system and reddened all the leaves or leaf parts directly corresponding to them. The vessels containing the parasite remained uncoloured and the leaves or leaf parts obtaining water from those tracheae remained green. A healthy tobacco-plant absorbed 130 cc solution in 24 hours, a diseased one 10 cc in the same time.

One healthy and two diseased tobacco-plants were placed in an eosine-solution at five o'clock in the afternoon. The following morning at eight o'clock the stems were barked (Fig. VI). The healthy stem (at the right), 1,65 m. high was quite reddened up to the top. The stem of a heavily diseased plant (at the left) showed light red longitudinal stripes to a height of 70 c.m., the upper part of 55 c.m. was uncoloured. The third stem of the moderately diseased plant, high 1,57 m. had alternately white and red lon-

gitudinal streaks, at the top one narrow red stripe was observable at one side.

This different absorption of the solution by the vessels was very well demonstrated in the tobacco-leaves, the first one of every eight leaves being seated quite at the same side of the stem. For this reason the 24 leaves of the tobacco-plant, mentioned in Table III, are divided into 8 vertical rows of 3 leaves.

When the top of a diseased tobacco-plant, placed in an eosine-solution, was cut off and was put itself in such a liquid, the limp leaves became turgescent and the green tissue became a dark red colour.

In which way the bacteria will influence the water supply in a plant? Possibly the cooperation of the factors, mentioned in the different theories, results in a deficit of water. These factors may be: 1o. rootdamage, 2o. substances secreted by the parasite in the vessels, upon which the plant reacts by gum-formation and discoloration of the vessel-walls, 3o. accumulation of bacteria here and there in the vessels. In this way *Bact. solanacearum* will create a condition, that MAC MILLAN (25) called „physiological drought".

HURSH (17) suggests that the abnormal functioning of the vascular system itself may be induced through noxious substances produced either by the pathogen directly or through the desintegration of the host cells.

Many cases of tracheomycoses and tracheobacterioses are characterized not only by wilting but also by stunting. According to the theory of decreased water and food supply this second symptom can be explained. However the theory of intoxication of the leaves is thus far confined to the explanation of wilt symptoms.

### § 5. Influence of external factors on the development of slime disease-symptoms of tobacco-leaves.

A deficit of water will cause wilting, but to which factors the occurrence of the brown spots on diseased tobacco leaves may be due?

As the eosine-experiments (§ 4) taught, that the interference with the water supply is a very important factor in the development of wilt-symptoms, the influence of artificial disturbance of the transpiration-stream in healthy plants was studied. Quite healthy looking, full-grown tobacco-plants in the fields of the Deli Experiment Station were operated in different ways. In some cases

small, rectangular pieces of xylem were cut out of the stem under several leaves, in other cases the midrib of some leaves was partly excavated at the base. Still a third method was used. Tobacco-plants were cut off, flamed at the cut-surface in order to ruin the vessels there and placed in a bottle of water out of doors.

All operations resulted in withering of the leaves. The rays of the tropical sun paled the green limp tissue here and there between the lateral veins. Such a slight discolouring of the leaf is characteristic of slime-disease of tobacco.

Some days after the operations some of the leaves showed the typical dry spots and resembled in this respect those of slime-diseased plants (Compare Fig. VII and Fig. VIII). During that short period the weather was windy, sometimes even stormy. The importance of that factor was not clear to me till afterwards.

The repeated comparison of leaves from truly diseased and from operated plants led to an exact observation of the symptoms of slime-disease. These are:

1o. a row of brown dry spots in the tissue between the lateral veins, parallel to these,

2o. a row of oval brown spots at one or two sides of the midrib, parallel to this, occurring in the tissue between the lateral veins quite near the midrib,

3o. dry spots here and there at the margin of the leaf.

Looking at the leaves with a magnifying-glass, other symptoms were observed besides. At the upper side of the three described areas of the leaf small finely black speckled streaks occur. The direction of these streaks is in the area between the lateral veins parallel to those veins, in the area along the midrib parallel to this and in the area at the margin they had no definite direction. The lower leaf side is characterized by a great deal of small folds and, looking in transmitted light, transparent spots may be observed here and there.

These observations suggested that bruising of the leaf parenchym by the wind might been an important factor for the development of the described symptoms. This supposition led to the following experiments. Quite green tobacco-leaves of healthy plants were gathered and exposed for a short time in the sun, so that they became limp. In this condition they were very quickly moved in the hand so as to imitate wind. Five or ten minutes later the leaves already showed the above mentioned black speckled streaks at the upper side, the dark small folds at the light green under side and the transparent spots, where the tissue was

injured. These symptoms occurred between the latteral veins, and here and there at the margin. The treated leaves were placed in water out of doors in the sun. The cut-surface of some of them was party provided with a little wax, so that the leaves remained somewhat limp. Other leaves recovered their turgescence and afterwards endured the whole treatment once more. In both cases the injured tissue of the transparent spots dried and became brown, so that the typical slime-disease symptoms resulted.

The same experiments were taken too with cut healthy tobacco-plants, the results were alike.

By moving quite turgescent leaves the tissue did not change at all or showed in some cases small ruptures. The more limp a leaf was, the more heavily it was bruised by moving.

By inspecting the truly diseased tobacco-plants in the fields of the Deli Experiment Station immediately after stormy weather, exactly the same symptoms were observed as those produced artificially. At that moment the transparent spots with injured tissue were not yet dried by the sun. It was also noticed that several diseased leaves showed an upward folding of the margins instead of the usual drooping. Very probably this movement may be the cause of the development of the oval spots along one or two sides of the midrib.

In the described operation-experiments the little piece of xylem was not always cut out quite under the leaves, but some-times a little aside, so that only a basal flap lost its turgescence. In such a case dry brown spots developed on that fold at one side of the midrib (Fig. VIII at the top right).

HUNGER (16), who studied the leaf spots of tobacco microscopically, mentions, that the cell walls are dissolved and the chlorophyll is quite disorganized.

Thus tobacco-leaves, which lost their turgescence by a decreased water supply, can develop the characteristic spot-symptoms by the external factors, wind and sun.

## § 6. Summary.

a. (§ 1, 2 and 3). The inoculation experiments with *Bacterium solanacearum* in tomato taught, that

1o. soil-humidity favours slime-disease,
2o. *Bacterium solanacearum* develops much more vigorously in

the vessels of a plant growing in wet soil than in the vessels of a plant growing in dry soil.

A luxuriant growth of *Bacterium solanacearum* on artificial media is prevented by a deficit of water. Possibly this need of water may be one of the causes, why the parasite develops more vigorously in plants growing in humid than in those growing in dry soil.

b. (§ 4 and 5). Different experiments with tobacco and tomato showed, that the leaves of a slime-diseased plant wilt by a deficit of water.

The plant reacts to the products secreted by *Bact. solanacearum* within the vessels in such a way, that the vessel-walls are discoloured yellowbrown and gum occurs in the vessels. Possibly the so-called „physiological drought" in a plant, attacked by *Bact. solanacearum*, may be partly due to mentioned influence of the secreted substances on the vascular system.

The spot-symptoms of the leaves of a slime-diseased tobacco-plant (dry brown spots at one or two sides of the midrib, between the lateral veins and here and there at the margin) can be explained by the action of the external factors: wind and sun on leaves, being in a limp condition by the interal factor: deficit of water.

Experiments showed, that the slime-disease symptoms of tobacco can be produced artificially. If the leaves of healthy tobacco-plants, brought in a limp condition by a deficit of water, are moved very quickly so as to imitate wind, transparent spots are observable between the lateral veins and at the leaf margin. By exposing the leaves to the sun, the injured tissue of the transparent spots dries and becomes brown afterwards.

In the same way the oval spots along the midrib can be explained by the moving of the longitudinal leaf-halves up and down in stormy-weather. Then the tissue along the midrib functions as jinge and is injured.

c. The results mentioned under a and b possibly may be respective indications to an explanation of the observations in practice: 1st favouring of the slime-disease by high groundwater-level and continual rains and 2d. important loss of product by heavy drought.

Finally the writer wishes to express her appreceation:

to the International Education Board for enabling her to make a study-trip to the Dutch East-Indies,

to the „Deli Plantersvereeniging" for allowing her to work at the Deli Experiment Station at Medan,

to Dr. J. KUIJPER, Director of the Deli Experiment Station and Dr. S. C. J. JOCHEMS, Under-Director, for helpful suggestions and criticisms whilst conducting this study,

to the staff of the Deli Experiment Station and the gentlemen, planters, for their kind and ready cooperation.

Wageningen, April 1929.

## Literatuur.

1. Bewley, W. F. „Sleepy disease" of the tomato. Ann. appl. Biol. Vol. 9, p. 116-133, 1922.
2. Brandes, E. W. Banana wilt. Phytopathology, Vol. 9, p. 339-389, 1919.
3. Breda de Haan, J. van. De slijmziekte bij de tabak in Deli. Teysmannia, Deel 8, p. 528-549. 1898.
4. Bussy, L. P. de. Verslag over de aan het Deli-Proefstation te Medan gedurende het jaar 1 Juli 1906 — 30 Juni 1907 verrichte werkzaamheden. Med. Deli Proefst., Jrg. 2, p. 99-104, 1907-1908.
5. Bussy, L. P. de. Verslag van het Deli Proefst. 1 Juli 1907-1908. Meded. Deli Proefst., Jrg. 3, p. 48-49, 1908-1909.
6. Bussy, L. P. de. Tweede gedeelte van het verslag over een reis in de tabaksstreken van Java. Med. Deli Proefst., Jrg. 4, p. 222-277. 1909-1910.
7. Cook, Mel. T. The southern bacterial wilt in New Jersey. Phytopathology, Vol. 4, p. 277-278. 1914.
8. Fahmy, T. The production by Fusarium Solani of a toxic excretory substance capable of causing wilting in plants. Phytopathology, Vol. 13, p. 543-550. 1923.
9. Garner, W. W., Wolf, F. A. en Moss, E. G. The control of tobacco wilt in the flue-cured district. U. S. Dept. Agric. Bull. No. 562. 1917.

10. Groenewege, J. Landbouwkundige onderzoekingen over de slijmziekte.
Med. Alg. Proefst. v. d. Landb., no. 12, 1922.

11. Hall, C. J. J. van. Ziekten en plagen der cultuurgewassen in Ned.-Indië in 1915.
Med. Lab. Plantenz., no. 20 (Buitenzorg), 1916.

12. Haskell, Royal J. Fusarium wilt of potato in the Hudson river valley, New York.
Phytopathology, Vol. 9, p. 223-260, 1919.

13. Haymaker, H. H. Relation of toxic excretory products from two strains of Fusarium lycopersici Sacc. to tomato wilt.
Journ. Agr. Res., vol. 36, p. 697-719. 1928.

14. Honing, J. A. De oorzaak der slijmziekte en proeven ter bestrijding.
Med. Deli Proefst., Jrg. 5 p. 1-19, p. 169-185 en p. 343-358. 1910-1911.

15. Honing, J. A. Onderzoekingen over de virulentie van Bacillus solanacearum tegenover verschillende Nicotianasoorten en -variëteiten.
Bull. Deli Proefst., no. 2. 1914.

16. Hunger, F. W. T. Overzicht der ziekten en beschadigingen van het blad bij Deli-tabak.
Med. 's Lands Plantentuin, No. 47, p. 20-25. 1901.

17. Hursh, C. R. The reactions of plant stems to fungous products.
Phytopathology, vol. 18, p. 603-610. 1928.

18. Hutchinson, C. M. Rangpur tobacco wilt. Mem. Dept. Agr. India, Bact.-Series, Vol. I, no. 2. 1913.

19. Janse, J. M. Korte berichten uit 's Lands plantentuin, uitgaande van den directeur der inrichting.
Teysmannia, Deel 3, p. 653-662. 1892.

20. Jochems, S. C. J. Handleiding voor de herkenning en bestrijding van de ziekten van Deli tabak.
Med. Deli Proefst. 2e Serie, no. 43. 1926.

21. Johnson, James. Tobacco diseases and their control. U. S. Dept. Agr., Dept.-Bull, No. 1256. 1924.

22. Kulkarni, G. S. & Mundkur, B. B. Studies in the wilt disease of cotton in the Bombay Karnatak. Mem. Dept. Agr. India, Vol. 17, p. 21-27. 1928.

23. Kuijper, J. Verslag van het Deli Proefstation over 1 Jan. 1926 — 31 Dec. 1926. Med. Deli Proefst. 2e Serie, no. 45. 1927.

24. Lek, H.A.A. v.d. Onderzoekingen over tracheomycosen: de Verticilliose van den komkommer. Med. Landbouwhoogeschool, Deel 15, p. 1-36. 1919.

25. Mac Millan, H. G. Fusarium-blight of potatoes under irrigation. Journ. Agr. Res., Vol. 16, p. 279-303. 1919.

26. Nakata, Katugoro. The tobacco wilt with special reference to the cause of the disease. (Nogaku- Kwai Ho) Tokyo. Repr. from Journ. Sc. Agr. Soc., No. 294. 1927. (Engelsch résumé).

27. Palm, B. T. Aanteekeningen over slijmziekte in Arachis hypogaea. Med. Inst. Plantenz., No. 52 (Buitenzorg). 1922.

28. Palm, B. T. De stand van het slijmziekte-vraagstuk in de Deli-tabak. Med. Deli Proefst., 2e Serie, no. 32. 1924.

29. Palm, B. T. Verslag van het Deli Proefstation over 1 Jan. 1925 — 31 Dec. 1925. Med. Deli Proefst., 2e Serie, no. 42. 1926.

30. Picado, C. Sur l'action à distance des champignons phytopathogènes. Cong. Path. Veg. Strasbourg, 1923, p. 28 — 34. Strasbourg.

31. Rosen, H. R. Efforts to determine the means by which the cotton-wilt fungus, Fusarium vasinfectum, induces wilting. Journ. Agr. Res., vol. 33, p. 1143-1162. 1927.

32. Smith, Erwin F. Bacteria in relation to plant deseases. Vol. 3. 1914.

33. Smith, Erwin F. & Godfrey, G. H. Bacterial wilt of castor bean (Ricinus communis L.) Journ. Agr. Res., vol. 21, p. 255-261. 1921.

34. Uyeda, Y. Bacillus Nicotianae, sp. nov.; die Ursache der Tabakwelkkrankheit oder Schwarzbeinigkeit in Japan.
Bull. Imp. Centr. Agr. Exp. Sta. Japan, vol. 1, p. 39-55. 1905.

35. White, Richard P. Studies on tomato wilt caused by Fusarium lycopersici Sacc.
Journ. Agr. Res., vol. 34, p. 197-239. 1927.

## Verklaring der figuren.

Fig. I. Twee tomatenplanten op 12 Jan. 1928 als bibit van 1 week geplant in floatine-potten met slijmzieken grond (links) en onbesmette aarde (rechts).
Gefotografeerd 20 Febr. 1928.

Fig. II. Wondinfectie met *Bacterium solanacearum* in 4 weken oude tomatenplantjes, die gedurende 3 dagen zeer weinig (bovenste rij), normaal (middelste rij) en sterk (onderste rij) begoten waren.
Infectie 16 Febr. 1928, gefotografeerd 20 Febr.
De contrôle-potten staan geheel links (C).

Fig. III. Wondinfectie met *Bact. solanacearum* in 2 weken oude tomatenplantjes, waarvan de 3 exemplaren links droog werden gehouden, de volgende 3 in een bakje met water stonden.
Infectie 3 Febr. 1928, gefotografeerd 4 Febr.
Rechts: contrôle-planten (C).

Fig. IV. Kunstmatige grondinfectie met *Bact. solanacearum* vóór het planten der bibit. De tomaat-kiemplanten van ± 2½ week oud werden in besmetten grond geplant. Gedurende 11 dagen ontvingen de drie groepen, elk van 16 planten, verschillende hoeveelheden vocht.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Onderaan: | 1. weinig begoten | : | 0% | slijmziek. |
| | 2. normaal „ | : | 25% | „ |
| | 3. sterk „ | : | 75% | „ |

Bovenaan: de drie groepen contrôle. Gefotografeerd 8 Maart 1928.

Fig. V. Kunstmatige grondinfectie met *Bact. solanacearum* voor het planten der bibit (zie Fig. IV).
Links: slijmzieke tomaat van de sterk begoten partij. (floatine-pot).
Rechts: contrôle-plant van de sterk begoten partij. (floatine-pot).
Gefotografeerd 8 Maart 1928.

Fig. VI. Drie tabaksstengels van 5 uur 's middags tot den volgenden morgen 8 uur in een eosine-oplossing geplaatst en daarna ontschorst.
Links: hout van de zwaar zieke plant weinig rood gekleurd.
Middenin: hout van de matig zieke plant met longitudinale roode en witte banden.
Rechts: hout van de gezonde plant intensief rood gekleurd.
Gefotografeerd 30 Juni '28.

Fig. VII. Blad van een slijmzieke tabaksplant.
Gefotografeerd 25 Juni 1928.

Fig. VIII. Blad van een gezonde tabaksplant, waarvan op 21 Juni een stukje van den hout-cylinder in den stengel onder het blad was weggesneden. Door inwerking van wind en zon op het slappe blad ontstonden de symptomen van slijmziekte. Bovenaan rechts: basale slip van een gezond tabaksblad, die door kunstmatig wegsnijden van hout in den stengel omboog langs de lijn, waarop thans de bruine vlekken zichtbaar zijn. Gefotografeerd 25 Juni 1928.

**Explanation of Figures.**

Fig. I. Two tomatoes transplanted as one week old seedlings in „floatine-pots" with „diseased" soil (at the left) and „healthy" soil (at the right).
Photographed Febr. 20, 1928, 8 days after transplanting.

Fig. II. Inoculation with *Bacterium solanacearum* by means of needlepricks in the stems of 4 weeks old tomato-plants, which during 3 days were watered scarcely (upper row), normally (middle row) and abundantly (lower row).
Inoculation Febr. 16, 1928, photographed Febr. 20.
At the left : controls (c).

Fig. III. Inoculation with *Bacterium solanacearum* by means of needlepricks in the stems of 2 weeks old tomato plants. The 3 pots at the left were kept in a dry condition, the other 3 next to those were placed in a plate with water.
Inoculation Febr. 3, 1928, photographed Febr. 4.
At the right : controls (c).

Fig. IV. Soil-inoculation with *Bacterium solanacearum* before transplanting the tomatoes.
The tomato-seedlings, old ± 2½ weeks, were planted in pots with inoculated soil. During 11 days the three groups each consisting of 16 plants received different quantities of water.
At the bottom:
1. scarcely watered : 0% slime-disease.
2. normally „ : 25% „ „
3. abundantly „ : 75% „ „
At the top : the 3 groups of controls.
Photographed March 8, 1928.

Fig. V. Soil-inoculation with *Bact. solanacearum* before transplanting the tomatoes (see Fig. IV).

At the left: slime-diseased tomato of the abundantly watered group.

At the right: control-plant. Photographed March 8, 1928.

Fig. VI. Three tobacco-plants cut off and placed in an eosine-solution at 5 o'clock in the afternoon. Next morning at 8 o'clock they were barked .

At the left: the xylem of the heavily diseased plant reddened only a little.

In the middle: the xylem of the moderately diseased plant showed longitudinal red and white streaks.

At the right: the xylem of the healthy plant coloured dark red. Photographed June 30, 1928.

Fig. VII. Tobacco-leaf showing the symptoms of slime-disease (natural infection).

Photographed June 25, 1928.

Fig. VIII. Leaf of a healthy tobacco-plant, operated on June 21 by means of cutting out of the stem a piece of xylem under the leaf. By the action of the factors, wind and sun, on the limp leaf the symptoms of slime-disease developed.

At the top right: basal flap of a healthy tobacco-leaf, which by artificial cutting out of xylem in the stem drooped along the line, where the brown spots originated. Photographed June 25, 1928.

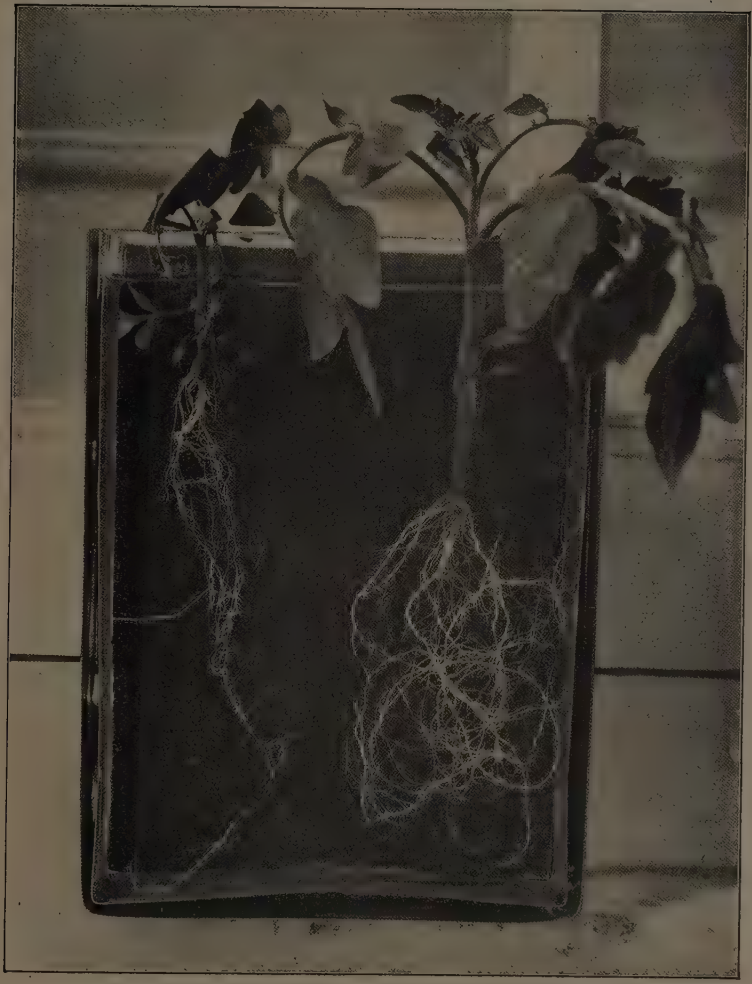

Fig. I.

Fig. II.

Fig. IV.

Fig. III.

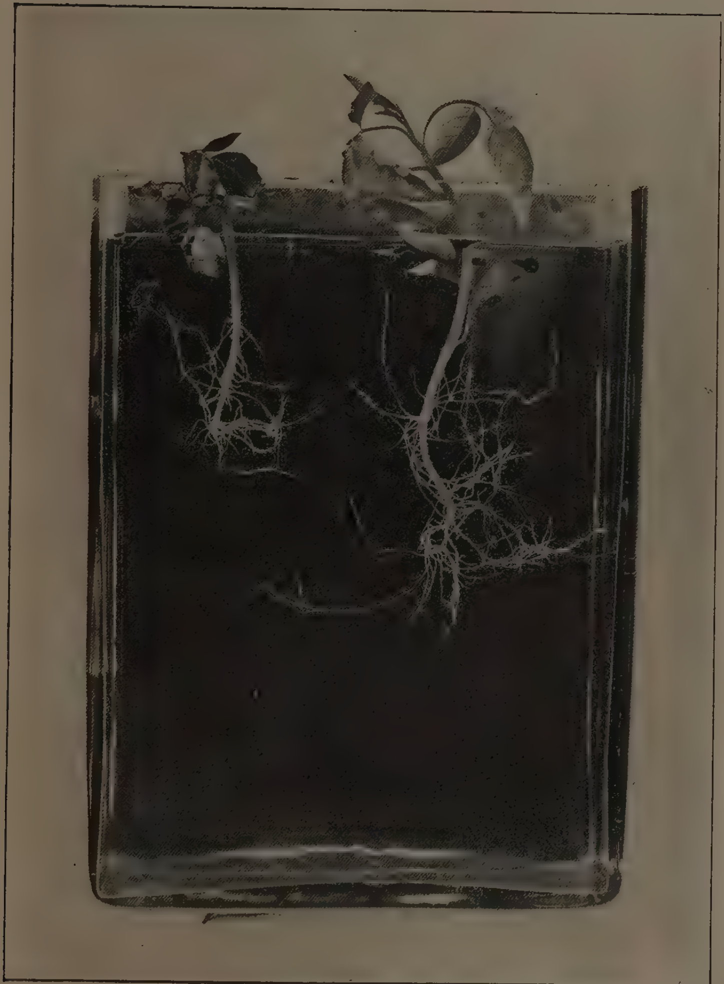

Fig. V.

Fig. VI.

Fig. VII.

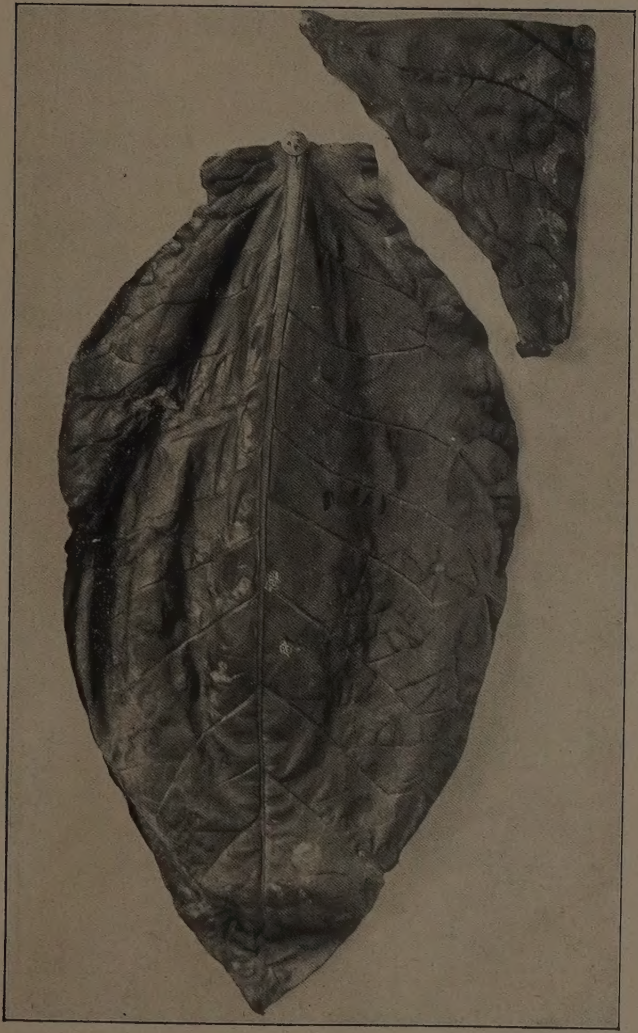

Fig. VIII.

9
1
A